

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEKRARLI KESİKLİ İŞLEMLE LAKKAZ ÜRETİMİ**

**EMRE BİRHANLI**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MALATYA  
TEMMUZ 2008**

**Tezin Başlığı:** Tekrarlı Kesikli İşleme Lakkaz Üretimi

**Tezi Hazırlayan:** Emre BİRHANLI

**Sınav Tarihi:** 17.07.2008

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Sınav Jürisi Üyeleri**

Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN  ..... Mustafa Kemal Üniversitesi

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA  ..... İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Murat ÖZMEN  ..... İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Sibel KAHRAMAN  ..... İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Dilek ASMA  ..... İnönü Üniversitesi

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Prof. Dr. Ali ŞAHİN  
Enstitü Müdürü

*En değerli varlığım Anneme ve s¼rekli ¼zlemimi ¼ektięim Babama...*

## Onur Sözü

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Tekrarlı Kesikli İşleme Lakkaz Üretimi**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.



Emre BİRHANLI

# ÖZET

Doktora Tezi

## TEKRARLI KESİKLİ İŞLEMLE LAKKAZ ÜRETİMİ

Emre BİRHANLI

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

125 + xi sayfa

2008

Danışman: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Lakkaz enzimi geniş substrat özgüllüğünden dolayı kağıt, tekstil, petrokimya gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisi gibi pek çok endüstriyel alanda kullanılabilir.

Beyaz çürükçül funguslar en iyi lakkaz üreticisi organizmalar olmalarına rağmen üretilen enzim miktarı endüstriyel alanlarda kullanım için yeterli değildir. Bu nedenle lakkaz üretim koşullarının optimize edilmesi gerekir. Bu çalışmada iyi lakkaz üreticileri olan *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* kullanılmış ve çeşitli koşullar optimize edilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları kesikli yonteme göre daha avantajlı olarak saptanan tekrarlı kesikli işlemle gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların çoğu STO (Stok Temel Ortam) ve STO+0.5 mM Cu ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Çalkalama, başlangıç pH' sı, inkübasyon sıcaklığı, pelet miktarı, zaman aralığı ve bakır konsantrasyonunun lakkaz üretimine etkisi araştırılmış ve her iki fungus için de optimum lakkaz üretim koşulları saptanmıştır. Daha sonra, bu fungusların lakkaz üretim yeteneğine en uygun koşullarda ABTS [2,2'-Azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)], şiringaldazin, guaiakol ve 2,5-ksilidin gibi indükleyicilerin etkisi test edilmiş ve her iki fungus için en etkili indükleyici maddeler ve konsantrasyonları saptanmıştır.

Çalışmanın son aşamasında *F. trogii* ve *T. versicolor* tarafından sentezlenen lakkaz enziminin moleküler ağırlıkları SDS PAGE ile saptanmıştır.

Bu çalışmanın sonuçları, uygun funguslar, yöntemler ve indükleyiciler kullanılarak optimum koşullar altında yüksek miktarlarda lakkaz elde edilebileceğini göstermektedir.

**ANAHTAR KELİMELER :** Enzim üretimi, optimizasyon, lakkaz enzimi, tekrarlı kesikli işlem, beyaz çürükçül funguslar, *Funalia trogii*, *Trametes versicolor*, fungal pelet, indükleyici madde

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### PRODUCTION OF LACCASE BY REPEATED BATCH PROCESS

Emre BİRHANLI

Inonu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

125 + xi pages

2008

Supervisor: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA (Ph. D.)

Because of its broad substrate specificity, the laccase enzyme can be used in many industrial fields.

Although the white rot fungi are the best laccase producer organisms, the amount they produce is not sufficient for industrial use. Hence, it is necessary to optimize the conditions in order to increase laccase enzyme production to be used in different fields. *Funalia trogii* and *Trametes versicolor* which are good laccase producers were used in this study and various culture conditions were optimized.

The optimization works were conducted in “repeated batch process”, which proved more advantageous to “batch process”. Most of the the studies were performed in SBM (Stock Basal Medium) and SBM+0.5 mM Cu media. The effect of agitation, initial pH, incubation temperature, amount of pellet, time interval and copper concentration on laccase production was investigated and optimum laccase production conditions were determined for both fungi. After that, the effect of some inducers such as ABTS [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], syringaldazine, guaiacol and 2,5-xylidine on laccase production ability of these fungi was tested under optimal conditions and the most effective inducers and their concentrations were determined for both fungi.

In the last stage of the study the molecular weights of the laccases, which were synthesized by *F. trogii* and *T. versicolor*, were determined by SDS PAGE.

The results of this study show that it is possible to obtain high amounts of laccase by using the suitable fungi, processes and inducers under optimal conditions.

**KEYWORDS:** Enzyme production, optimization, laccase enzyme, repeated batch process, white rot fungi, *Funalia trogii*, *Trametes versicolor*, fungal pellet, inducer material

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın seçimi ve planlanmasında olduğu gibi deneysel ve teorik çalışmalarım sırasında da değerli katkılarda bulunan, yardım, öneri ve desteğini esirgemedi beni yönlendiren, her zaman örnek aldığım çok değerli danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA' ya;

Tez sürecinde yapılan toplantılarda fikirlerini ve önerilerini paylaşan Tez İzleme Komitesi Üyeleri Hocalarım Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN' e ve Doç. Dr. Sibel KAHRAMAN' a

SDS PAGE ve Native PAGE çalışmalarımın görüntülenmesi işlemlerini büyük bir titizlikle gerçekleştiren Yrd. Doç. Dr. Birol MUTLU' ya;

Çalışmalarım esnasında manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli dostlarım Arş. Grv. Gülçin BEKER AKBULUT, Öğr. Grv. Dr. Murat CANDAN ve nişanlım İlksen Seha KESER' e;

Çalışmalarımda bana destek olan Yrd. Doç Dr. Ayşe BİRHANLI, Uzman Ogün BİRHANLI, Arş. Grv. Filiz KURU ve Barış Can KARADAĞ' a;

Bu tez çalışmasını 2007/40 nolu proje olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi' ne;

Tüm hayatım boyunca yardımlarını ve desteklerini gördüğüm AİLEM' e;  
Ve desteklerini hissettiğim tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma;

en içten duygularıyla teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyoteknoloji.....	1
1.1.1. Kırmızı biyoteknoloji.....	2
1.1.2. Yeşil biyoteknoloji.....	2
1.1.3. Gri biyoteknoloji.....	3
1.1.3.a. Fiziksel kirlenme.....	3
1.1.3.b. Kimyasal kirlenme.....	4
1.1.3.c. Biyolojik kirlenme.....	4
1.1.4. Beyaz biyoteknoloji.....	5
1.1.5. Mavi biyoteknoloji.....	5
1.2. Biyoteknolojide Kullanılan Mikroorganizmalar.....	5
1.2.1. Funguslar.....	6
1.3. Çürükçül Funguslar.....	8
1.3.1. Kahverengi çürükçül funguslar.....	10
1.3.2. Yumuşak çürükçül funguslar.....	11
1.3.3. Beyaz çürükçül funguslar.....	12
1.4. Beyaz Çürükçül Fungusların Lignolitik Enzimleri.....	15
1.4.1. Lignin peroksidaz (Ligninaz) (LiP, EC 1.11.1.14).....	15
1.4.2. Mangan peroksidaz (MnP, EC 1.11.1.13).....	16
1.4.3. Lakkaz (Lac, EC 1.10.3.2).....	17
1.5. Lakkaz Enziminin Biyoteknolojide Kullanım Alanları.....	22
1.5.1. Lakkaz enziminin kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kullanımı.....	22
1.5.2. Lakkaz enziminin çeşitli atık suların muamelesinde kullanımı.....	23
1.5.3. Lakkaz enziminin çeşitli pestisit ve ksenobiyotiklerin biyolojik iyileştirilmesinde kullanımı.....	26
1.5.4. Lakkaz enzimi geninin etanol üretim veriminin artırılması amacıyla klonlanması.....	26
1.5.5. Lakkaz enziminin biyosensör olarak kullanımı.....	27
1.5.6. Lakkaz enziminin gıda endüstrisinde kullanımı.....	27
1.5.7. Lakkaz enziminin tekstil endüstrisinde kullanımı.....	29
1.5.8. Lakkaz enziminin çeşitli boya renklerinin gideriminde kullanımı.....	30
1.5.9. Lakkaz enziminin diğer endüstriyel alanlarda kullanımı.....	32
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	33
2.1. Beyaz Çürükçül Fungusların Lakkaz Üretimine Artırılmasına Yönelik Çalışmalar.....	33
2.1.1. Çeşitli ağır metallerin ve üretim metotlarının lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	33
2.1.2. Çeşitli ortamların ve indükleyicilerin lakkaz üretimi ve aktivitesi üzerine etkisi.....	42
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	51
3.1. Çalışmalarda Kullanılan Funguslar.....	51



3.2.	Çalışmalarda Kullanılan Fungusların Katı Besiyerinde Üretimi ve Saklanması.....	51
3.3.	Çalışmalarda Kullanılan Fungusların Sıvı Besiyerinde Üretimi ve Peletlerin Hazırlanması.....	51
3.4.	Çalışmalarda Enzim Üretim Ortamı Olarak Kullanılan Besiyerlerinin İçeriği ve Hazırlanması.....	52
3.4.1.	Çalışmalarda enzim üretim ortamı olarak kullanılan STO ile STO+0.5 mM CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O'nun içeriği ve hazırlanması.....	52
3.5.	Lakkaz Üretim Yöntemleri.....	53
3.5.1.	Kesikli yöntem.....	53
3.5.2.	Tekrarlı kesikli yöntem.....	53
3.6.	Optimizasyon Çalışmaları.....	54
3.6.1.	Bakırın lakkaz üretimi üzerine etkisinin saptanması.....	54
3.6.2.	Çalkalama hızının lakkaz üretimi üzerine etkisinin saptanması.....	54
3.6.3.	Besiyeri pH' sının lakkaz üretimi üzerine etkisinin saptanması.....	54
3.6.4.	İnkübasyon sıcaklığının lakkaz üretimi üzerine etkisinin saptanması...	54
3.6.5.	Pelet miktarının lakkaz üretimi üzerine etkisinin saptanması.....	54
3.6.6.	İnkübasyon sürelerinin lakkaz üretimi üzerine etkisinin saptanması....	55
3.7.	İndükleyci Maddelerin Lakkaz Üretim Verimine Etkisinin Saptanması.....	55
3.7.1.	ABTS.....	55
3.7.2.	Şiringaldazin.....	55
3.7.3.	Guaiakol.....	56
3.7.4.	2,5-ksilidin .....	56
3.8.	Farklı Besiyerlerinin Lakkaz Üretim Verimine Etkisinin Saptanması...	56
3.8.1.	Distile su ve Distile su+0.5 mM Cu.....	56
3.8.2.	SDB ve SDB+0.5 mM Cu.....	56
3.8.3.	MEB ve MEB+0.5 mM Cu.....	56
3.9.	Fungusların Aljinat Jel İçerisine Tutuklanması.....	57
3.10.	Analizler.....	58
3.10.1.	Kültür ortamındaki lakkaz aktivitesinin tayini.....	58
3.10.2.	Kuru ağırlığın saptanması.....	58
3.10.3.	Ağırmetal miktarının analizi.....	58
3.10.4.	Toplam protein miktarının saptanması.....	59
3.11.	İstatistiksel Analiz.....	59
3.12.	Poliakrilamid Jel Elektforezi Çalışmaları.....	59
3.12.1.	Hesaplama yöntemi.....	61
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	62
4.1.	Tekrarlı Kesikli Süreçte Yürütülen Optimizasyon Çalışmaları.....	63
4.1.1.	Bakır' ın <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> ' un lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	63
4.1.2.	İnkübasyon sıcaklığının <i>Funalia trogii</i> ve <i>Trametes versicolor</i> ' un lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	64
4.1.3.	Çalkalama hızının <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> ' un lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	68
4.1.4.	Ortam pH' sının <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> ' un lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	72
4.1.5.	Farklı pelet miktarlarının <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> ' un lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	76

4.2.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> Peletlerinin Farklı İnkübasyon Süreleri ve Süreçlerinde Lakkaz Üretimi.....	77
4.3.	Tutuklanmış <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> Hücreleri İle Lakkaz Üretimi...	82
4.4.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> Peletlerinin Farklı Ortamlarda Lakkaz Üretimini Karşılaştırılması.....	85
4.5.	İndükleiyici Maddelerin STO ve STO+Cu Ortamlarında <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> Peletlerinin Lakkaz Üretimine Etkisi.....	88
4.5.1.	ABTS eklenmiş STO ve STO+Cu ortamlarında <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> peletleri ile lakkaz üretimi.....	88
4.5.2.	Şiringaldazin eklenmiş STO ve STO+Cu ortamlarında <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> peletleri ile lakkaz üretimi.....	92
4.5.3.	Guaiakol eklenmiş STO ve STO+Cu ortamlarında <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> peletleri ile lakkaz üretimi.....	95
4.5.4.	2,5-ksilidin (2,5-dimetilanilin) eklenmiş STO ve STO+Cu ortamlarında <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> peletleri ile lakkaz üretimi.....	99
4.6.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> ' un İnkübasyonun 1. ve 5. Günlerinde Kültür Sıvısındaki Bakır Miktarının Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi İle Tespit Edilmesi.....	103
4.7.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> Lakkaz Enzimlerinin Spesifik Aktiviteleri...	104
4.8.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> Lakkaz Enzimlerinin Moleküler Ağırlıkları...	104
4.9.	Çeşitli Ortamlarda Üretilen <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> Lakkazlarının Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Üzerinde Gösterilmesi.....	107
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	110
6.	KAYNAKLAR.....	115
	ÖZGEÇMİŞ.....	125

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Kahverengi çürükçül fungus tarafından çürütülmüş odunun şekli.....	10
Şekil 1.2.	Çürütülmemiş odunun (A) ve yumuşak çürükçül fungus tarafından çürütülmüş odunun (B) taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiş şekli.....	12
Şekil 1.3.	Beyaz çürükçül fungus tarafından çürütülmüş odunun şekli.....	13
Şekil 1.4.	Beyaz çürükçül fungus tarafından eşzamanlı (A) ve seçici olarak (B) çürütülmüş odunun taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiş şekli.....	14
Şekil 1.5.	Lignin peroksidaz ve glioksal oksidazın basitleştirilmiş reaksiyonları.....	16
Şekil 1.6.	Mangan peroksidaz ve lakkazın basitleştirilmiş reaksiyonları...	17
Şekil 1.7.	Lakkazlar tarafından katalizlenen fenol oksidasyonunun şematik görünüşü.....	19
Şekil 1.8.	Mediator varlığında gerçekleşen lakkaz reaksiyonu ve bazı lakkaz mediatörleri.....	20
Şekil 1.9.	Lakkaz enziminin katalitik bölgesinin yapısı ve katalitik bölgede gerçekleşen oksidasyon mekanizması.....	21
Şekil 1.10.	Lakkaz enziminin moleküler yapısının (A) ve katalitik bölgesinin (B) şematik görünümü.....	22
Şekil 1.11.	Tekstil yaş işleme ve kot kumaşının ağartılmasında lakkaz kullanımı.....	30
Şekil 3.1.	Serbest ve tutuklanmış <i>Funalia trogii</i> ATCC 200800 hücrelerinin görünümü.....	57
Şekil 3.2.	Serbest ve tutuklanmış <i>Trametes versicolor</i> ATCC 200801 hücrelerinin görünümü.....	57
Şekil 3.3.	Akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid ve poliakrilamid jelin kimyasal yapısı.....	60
Şekil 3.4.	Molekül ağırlıkları (kDa) belli olan proteinlerin standart eğri grafiği.....	61
Şekil 4.1.	Farklı inkübasyon sıcaklıklarının STO ve STO+Cu besiyerlerinde 24 saat inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	65
Şekil 4.2.	Farklı inkübasyon sıcaklıklarının 24 saatlik inkübasyon sürecinde STO ve STO+Cu besiyerlerinde 24 saat inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	66
Şekil 4.3.	Farklı inkübasyon sıcaklıklarının STO besiyerinde inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	66
Şekil 4.4.	Farklı inkübasyon sıcaklıklarının STO+Cu besiyerinde üretilen <i>F. trogii</i> peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	67
Şekil 4.5.	Farklı inkübasyon sıcaklıklarının STO besiyerinde üretilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	67
Şekil 4.6.	Farklı inkübasyon sıcaklıklarının STO+Cu besiyerinde inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	68
Şekil 4.7.	Farklı çalkalama hızlarının STO ve STO+Cu besiyerlerinde inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi..	69

Şekil 4.8.	Farklı çalkalama hızlarının STO ve STO+Cu besiyerlerinde inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	69
Şekil 4.9.	Farklı çalkalama hızlarının STO besiyerinde inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	70
Şekil 4.10.	Farklı çalkalama hızlarının STO+Cu besiyerinde inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	70
Şekil 4.11.	Farklı çalkalama hızlarının STO besiyerinde inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	71
Şekil 4.12.	Farklı çalkalama hızlarının STO+Cu besiyerinde inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	71
Şekil 4.13.	Farklı ortam pH' larının sürecinde STO ve STO+Cu besiyerlerinde 24 saat inkübe edilen <i>F. trogii</i> ' nin lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	73
Şekil 4.14.	Farklı ortam pH' larının STO ve STO+Cu besiyerlerinde 24 saat inkübe edilen üretilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	73
Şekil 4.15.	Farklı ortam pH' larının STO besiyerinde inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi..	74
Şekil 4.16.	Farklı ortam pH' larının STO+Cu besiyerinde inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	74
Şekil 4.17.	Farklı ortam pH' larının STO besiyerinde inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	75
Şekil 4.18.	Farklı ortam pH' larının STO+Cu besiyerinde inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi.....	75
Şekil 4.19.	Tekrarlı kesikli süreçte STO ortamında 12 gün boyunca inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	80
Şekil 4.20.	Tekrarlı kesikli süreçte STO+Cu ortamında 12 gün boyunca inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	80
Şekil 4.21.	Tekrarlı kesikli süreçte STO ortamında 12 gün boyunca inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	81
Şekil 4.22.	Tekrarlı kesikli süreçte STO+Cu ortamında 12 gün boyunca inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)...	81
Şekil 4.23.	Tutuklanmış <i>F. trogii</i> hücrelerinin tekrarlı kesikli süreçte STO ortamında lakkaz üretimi (U/mL).....	83
Şekil 4.24.	Tutuklanmış <i>F. trogii</i> hücrelerinin tekrarlı kesikli süreçte STO+Cu ortamında lakkaz üretimi (U/mL).....	83
Şekil 4.25.	Tutuklanmış <i>T. versicolor</i> hücrelerinin tekrarlı kesikli süreçte STO ortamında lakkaz üretimi (U/mL).....	84
Şekil 4.26.	Tutuklanmış <i>T. versicolor</i> hücrelerinin tekrarlı kesikli süreçte STO+Cu ortamında lakkaz üretimi (U/mL).....	84
Şekil 4.27.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> peletlerinin STO+Cu+ABTS ortamlarının ilavesinden kısa bir süre sonraki görünümü.....	88
Şekil 4.28.	ABTS içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	89

Şekil 4.29.	ABTS içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	89
Şekil 4.30.	ABTS içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	90
Şekil 4.31.	ABTS içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	90
Şekil 4.32.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> peletlerinin STO+Cu+şiringaldazin ortamlarının ilavesinden kısa bir süre sonraki görünümü.....	92
Şekil 4.33.	Şiringaldazin içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	93
Şekil 4.34.	Şiringaldazin içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	93
Şekil 4.35.	Şiringaldazin içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)...	94
Şekil 4.36.	Şiringaldazin içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)...	94
Şekil 4.37.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> peletlerinin STO+Cu+guaiakol ortamlarının ilavesinden kısa bir süre sonraki görünümü.....	96
Şekil 4.38.	Guaiakol içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	96
Şekil 4.39.	Guaiakol içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	97
Şekil 4.40.	Guaiakol içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)..	97
Şekil 4.41.	Guaiakol içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)..	98
Şekil 4.42.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> peletlerinin STO+Cu+2,5-ksilidin ortamlarının ilavesinden kısa bir süre sonraki görünümü.....	99
Şekil 4.43.	2,5-ksilidin içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	100
Şekil 4.44.	2,5-ksilidin içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	100
Şekil 4.45.	2,5-ksilidin içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)..	101
Şekil 4.46.	2,5-ksilidin içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL)..	101
Şekil 4.47.	<i>F. trogii</i> ham kültür filtratlarındaki lakkaz enzimlerinin SDS PAGE' de görüntülenmesi (Coomassie boyama).....	105
Şekil 4.48.	<i>T. versicolor</i> ham kültür filtratlarındaki lakkaz enzimlerinin SDS PAGE' de görüntülenmesi (Coomassie boyama) .....	106
Şekil 4.49.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> ham kültür filtratlarındaki lakkaz enzimlerinin doğal poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmesi (Coomassie boyama).....	108
Şekil 4.50.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> ham kültür filtratlarındaki lakkaz enzimlerinin doğal poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmesi (Aktivite boyama).....	109

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Bazı funguslar tarafından üretilen endüstriyel açıdan önemli ürünler.....	6
Çizelge 1.2.	Bazı funguslar tarafından üretilen endüstriyel açıdan önemli enzimler.....	7
Çizelge 3.1.	Stok temel ortam (STO) ve STO+0.5mM Cu' nun içeriği.....	52
Çizelge 4.1.	Bakır eklenmiş STO' da <i>F. trogii</i> peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL).....	63
Çizelge 4.2.	Bakır eklenmiş STO' da <i>T. versicolor</i> peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL).....	64
Çizelge 4.3.	Farklı miktarlarda <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)..	77
Çizelge 4.4.	Farklı miktarlarda <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL).....	77
Çizelge 4.5.	Kesikli ve tekrarlı kesikli süreçte <i>F. trogii</i> peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL).....	78
Çizelge 4.6.	Kesikli ve tekrarlı kesikli süreçte <i>T. versicolor</i> peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL).....	79
Çizelge 4.7.	Tekrarlı kesikli süreçte Distile su ve Distile su+Cu ortamında <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL).....	85
Çizelge 4.8.	Tekrarlı kesikli süreçte SDB ve SDB+Cu ortamında <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL).....	86
Çizelge 4.9.	Tekrarlı kesikli süreçte MEB ve MEB+Cu ortamında <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL).....	86
Çizelge 4.10.	Stok STO ve STO+Cu çözeltisi ile <i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> kültür sıvılarında analiz edilen bakır oranı.....	103

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	Amerikan tip kültür koleksiyonu
STO	Stok temel ortam
mM	Milimolar
Cu	Bakır
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)
SDS PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
Native PAGE	Doğal poliakrilamid jel elektroforezi
<i>F. trogii</i>	<i>Funalia trogii</i>
<i>T. versicolor</i>	<i>Trametes versicolor</i>
DNA	Deoksiribonükleik asit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
LiP	Lignin peroksidaz
MnP	Mangan peroksidaz
Lac	Lakkaz
GLOX	Glioksal oksidaz
AAO	Aril alkol oksidaz
kDa	kilodalton
HBT	Hidroksil benzo triazol
TNT	2,4,6-trinitrotoluen
PVPP	Polivinilpolipirrolidon
µM	Mikromolar
U	Ünite
U/mL	Ünite/mililitre
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Bakır sülfat penta hidrat
nkat	Nano katal
MSB	Mineral tuz ortamı
MEB	Malt ekstrakt broth
DMSO	Dimetilsülfoksit
SDA	Sabouraud dekstroz agar
SDB	Sabouraud dekstroz broth
HCl	Hidroklorik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
rpm	Dakikada dönme hızı
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
NaCl	Sodyum klorür
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
OD	Optik yoğunluk
Rf	Gecikme faktörü
BSA	Sığır serum albumini

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji biyolojiden köken almış bir bilim dalı olup, oldukça geniş bir çalışma alanını içermektedir [1]. Biyoteknoloji; moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, genetik, fizyoloji ve biyokimya gibi doğa bilimleri yanında çeşitli mühendislik alanlarından yararlanarak, rekombinant DNA teknolojisiyle bitki, hayvan ve mikroorganizmaları geliştirmek, doğal olarak var olmayan veya yeteri kadar üretilmeyen yeni ve az bulunan maddeleri elde etmek için kullanılan teknolojilerin tümüdür. Biyoteknoloji, temel bilim buluşlarını kısa sürede yararlı ticari ürünlere dönüştürebilmesiyle bir anlamda kendi talebini de yaratabilir. Bu yönüyle de öteki teknolojilerden ayrılır. Örneğin sıcak su kaynaklarında yaşayan bakteri türlerinin birinden elde edilen yüksek sıcaklığa dayanıklı bir enzim, günümüzde uygulama ve temel bilim çalışmalarının ayrılmaz bir parçası olan PCR' in önemli bir girdisidir. Biyoteknoloji uygulamaları; mikrobiyoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, hücre biyolojisi, immünoloji, protein mühendisliği, enzimoloji ve biyoproses teknolojileri gibi farklı alanları bünyesinde toplar. Bu nedenle de biyoteknoloji birçok bilimsel disiplinle karşılıklı ilişki içinde gelişir [2].

Diğer bir ifade ile biyoteknoloji, fen ve mühendislik bilimlerinin entegre uygulaması anlamına gelmektedir [3]. Burada amaç, organizmaların ve organizma bileşenlerinin alkol, antibiyotik, aşı, organik asit, enzim, vitamin ve hormon gibi çeşitli ürünlerin üretiminde kullanılmasıdır. Buna ilaveten çeşitli organizma ve bileşenleri atık suların arıtımı, kömürün, atıkların, petrol ve yan ürünlerinin, pestisitlerin yıkımı, kömürden biyolojik işleme kükürdün uzaklaştırılması, ağır metallerin giderimi gibi farklı işlemlerin gerçekleştirilmesinde de kullanılmaktadır [1, 3].

Buna göre biyoteknolojik çalışmalar sonucu elde edilen ürünlerin insanlığın yararına sunulduğu düşünülürse, biyoteknoloji insanın yaşam kalitesini artırmak amacıyla tasarlanmış ürünlerin üretimi için biyolojik süreçlerin, organizmaların veya sistemlerin kullanımını olarak da tanımlanabilir [4].



Buna göre biyoteknoloji pek çok sanayi alanında kullanım potansiyeline sahiptir.

Bunlar:

- Kimya ve ecza sanayi,
- Besin ve lezzet sanayi,
- Atık su, katı atık ve kirli hava arıtma sanayi,
- Fen bilimleri ve tıp alanlarında çalışan araştırma kurumları,
- Biyoteknolojik cihaz ve tesis geliştirilmesi, pazarlaması ve danışmanlığıdır [3].

Biyoteknoloji, uygulama alanlarına göre farklı dallara ayrılmaktadır. Bunlar kırmızı, yeşil, gri, beyaz ve mavi biyoteknolojidir [3, 5].

### **1.1.1. Kırmızı biyoteknoloji**

Kırmızı biyoteknoloji yeni ilaçlar üretebilmek için yeni organizmaların elde edilebilmesi, hasarlı insan dokularının tamir edilebilmesi veya tüm organın yeniden gelişimi için kök hücrelerin kullanımı, antibiyotik üretimi için organizma tasarlanması, genomik manipülasyon aracılığıyla genetik tedavi mühendisliği, insan evrimi ve çeşitli hastalıkların kökenini anlamada ilerleme kaydedilebilmesi için DNA analizi, hastalıkların belirlenmesi için doku kültürü gibi tıbbi işlemleri içermektedir [4].

### **1.1.2. Yeşil biyoteknoloji**

Yeşil biyoteknoloji modern bitki üretiminin uygulama alanını kapsamaktadır [3]. Biyolojik gübre ve biyopestisit eldesi de yeşil biyoteknolojinin uygulama alanına girer. Diğer bir ifade ile yeşil biyoteknoloji tarımsal işlemlere uygulanan biyoteknolojidir [4]. Yeşil biyoteknolojinin en önemli alanlarından biri gen teknolojisidir. Gen teknolojisi, belirli genleri bir türden diğer bir tür bitkiye aktarmayı, bu şekilde de direnç geliştirmeyi olanaklı kılmaktadır [3]. Buna örnek olarak özel çevresel koşullarda ya da bazı tarımsal kimyasalların varlığında veya yokluğunda gelişen transgenik bitkilerin elde edilebilmesi verilebilir. Pestisit sentezleyen bitki oluşturarak dışarıdan pestisit uygulanmasının ortadan kaldırılması da yeşil biyoteknolojiye verilebilecek diğer bir örnektir [4].

### **1.1.3. Gri biyoteknoloji**

Gri biyoteknoloji çevre teknolojisi alanıyla ilgilenmektedir. Biyoteknoloji süreçleri burada toprağı arıtma, atık su, atık gaz, kirli hava temizleme, çöp ve diğere atıkların değeriendirilmesi gibi konuları içermektedir [3].

Gri biyoteknolojinin çalışma alanları çevre ve atık biyoteknolojisi adı altında da incelenabilmektedir. Çevre; insanların ve diğere canlıların yaşamları boyunca ilişkilerini sürdürdükleri ve karşılıklı olarak etkileşim içinde buldukları fiziki, biyolojik, sosyal, ekonomik ve kültürel ortamdır [6].

Bir başka ifade ile çevre, canlı varlıkların yaşamsal bağlarla bağlı oldukları, etkiledikleri ve aynı zamanda çeşitli yollardan etkilendikleri alandır [7] ve bu alan yeryüzünde ilk canlı ile birlikte var olmuştur [6].

Hava, su ve toprak çevrenin fiziksel unsurlarını, insanlar, hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar ise biyolojik unsurlarını teşkil etmektedir [1, 7].

Sağlıklı bir yaşamın sürdürülmesi ancak sağlıklı bir çevre ile mümkündür. Bir ilişkiler sistemi olan çevrenin bozulması ve çevre sorunlarının ortaya çıkması, genellikle insan kaynaklı etkenlerin doğal dengeleri bozmasıyla başlamıştır. İnsan yaşamı çeşitli dengeler üzerine kurulmuştur. İnsanın çevresiyle oluşturduğu doğal dengeyi meydana getiren zincirin halkalarında meydana gelen kopmalar, zincirin tümünü etkileyip, bu dengenin bozulmasına sebep olmakta ve çevre sorunlarını oluşturmaktadır [6].

Çevrenin temel unsurlarından olan doğa, kendine has fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Bu özellikler dikkate alındığında çevre kirliliğı şu bölümlere ayrılır:

#### **1.1.3.a. Fiziksel kirlenme**

Çevreyi meydana getiren toprak, su ve havanın fiziksel özelliklerinin tamamının veya bir kısmının insan, hayvan ve bitki sağlığını tehdit edecek, olumsuz yönde etkileyecek biçimde bozulması ve değışmesi olayıdır. Örneğini; çeşitli fabrika atıklarının akarsu ve göllere boşaltılması, doğal erozyon ile toprakların göl ve denizlere taşınması doğal su kaynaklarının açık kahverengiden, kırmızı siyaha kadar değışen renklerde görünmesine neden olmaktadır. Bu olay suların fiziksel kirlenmesidir.

### **1.1.3.b. Kimyasal kirlenme**

Doğal çevreyi oluşturan toprak, su ve havanın kimyasal özelliklerinin canlıların hayati faaliyetlerini ve aktivitelerini olumsuz yönde etkileyecek biçimde bozulmasıdır. Örneğin; çeşitli fabrikalara ait katı ve sıvı atıkların verimli tarım arazilerine veya akarsu ve nehirlere boşaltılması söz konusu tarım topraklarının, akarsu ve göllerin zararlı ağır metallere kirlenerek kimyasal kirlenmeye maruz kaldığını gösterir.

### **1.1.3.c. Biyolojik kirlenme**

Doğal ortamı oluşturan toprak, hava ve suyun çeşitli mikroorganizmalarla kirlenmesi ve dolayısıyla mikrobiyolojik yapının bozulması mikrobiyal kirlenmeyi, aynı ortamların mikroorganizmalarla kirlenmesi ise biyolojik kirlenmeyi tanımlar. Örneğin, tarım alanlarının kanalizasyon suyu ile sulanması veya kanalizasyon sularının akarsu, göl ve denizlere boşaltılması ile kanalizasyon sularında bulunan hastalık yapıcı mikroorganizmalar toprağa, suya ve atmosfere geçerek bu ortamların mikrobiyolojik kirlenmesine yol açar.

Çevre unsurlarına göre de çevre kirliliği 5 gruba ayrılır:

- Hava kirliliği,
- Toprak kirliliği,
- Su kirliliği [8],
- Gürültü kirliliği,
- Radyoaktif kirlenme [6].

Gelişmekte olan ülkelerde ortaya çıkan hızlı sanayileşme çabaları, bu ülkelerde hızlı şehirleşme sürecini de beraberinde getirmiştir [9].

Birçok sanayi dalının gelişmesi, var olanların etkinliğini artırması ve sürekli artan şehir nüfusu doğal kaynakların kirlenmesine neden olmuştur. Bu durum çevre sorunlarının çözümüne yönelik teknolojilerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu teknolojilerden biri olan çevre ve atık biyoteknolojisi, canlı organizmalar ve onlardan elde edilen ürünler ile belirli bir zaman ve yerde kullanılmayan, geri kazanılmayan ve dönüştürülemeyen, pek çoğu sağlık ve çevre sorunlarına neden olan atıkların arıtımına ve çevre kirliliğinin önlenmesine yönelik çalışmaları kapsamaktadır. Çevre ve atık biyoteknolojisi çalışmaları atıklardan metal uzaklaştırılması veya geri kazanılmasını da kapsamaktadır. Geleneksel yöntemlerden çok daha verimli olan çevre

ve atık biyoteknolojisi sayesinde, yüksek sıcaklıklarda yakma ve atık sahaları oluşturma gibi yöntemlere alternatifler oluşturulabilmektedir [1].

#### **1.1.4. Beyaz biyoteknoloji**

Beyaz biyoteknoloji fermentasyon biyoteknolojisi ve enzim biyoteknolojisi gibi uygulama alanlarını kapsamaktadır. Fermentasyon biyoteknolojisi çeşitli besin ve içeceklerin, biyopolimerlerin, antibiyotik ve önemli bazı ilaçların, endüstriyel açıdan son derece önemli pek çok kimyasal maddenin üretimini ve üretimin optimizasyonu amacıyla yeni fermentör dizaynı gibi konuları içermektedir. Enzim biyoteknolojisi ise enzim üretimi, izolasyonu, saflaştırılması, enzimlerin çözünür halde kullanılması, tutuklanması ve enzimlerin reaktör sistemlerinde kullanılması gibi alanları içermektedir.

Enzim teknolojisi ayrıca teşhis, tedavi, besin üretimi, enerji kıtlığını önleme ve çevrenin geliştirilmesi gibi problemlere de çözümler üretmektedir [1]. Beyaz biyoteknoloji üretim ve hizmet faaliyetlerini doğal kaynakları ve çevreyi koruyarak gerçekleştirmeyi amaçlamaktadır [3].

#### **1.1.5. Mavi biyoteknoloji**

Mavi biyoteknoloji deniz organizmalarının ve sucul işlemlerin teknik değerlendirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır [3, 5].

### **1.2. Biyoteknolojide Kullanılan Mikroorganizmalar**

Biyoteknolojinin tüm uygulama alanlarında kullanılan ana biyolojik sistemler mikroorganizmalardır. Bakteriler, funguslar, algler, protozoonlar ve virüsler mikroorganizmalar içerisinde ele alınmaktadır. Virüsler tam bir hücreli yapı olmamalarına karşın bunlardan biyoteknolojik yöntemlerle aşı hazırlanması, mikrobiyal pestisit eldesi gibi uygulamalar virüsleri biyoteknolojide önemli kılmaktadır. Funguslar biyoteknolojinin pek çok alanında kullanılan son derece önemli organizmalardır [1].

### 1.2.1. Funguslar

İnsan yaşamı açısından düşünüldüğünde funguslar biyoteknolojik açıdan en yararlı organizmalar olarak ifade edilebilir. Özellikle filamentli funguslar ve mayaların biyoteknolojide uygulama alanları oldukça geniştir. Endüstriyel açıdan son derece önemli olan funguslar çeşitli antibiyotiklerin, biyoaktif bileşiklerin, organik asitlerin, gıdaların (Çizelge 1.1) ve enzimlerin üretiminde (Çizelge 1.2) kullanılmaktadır.

**Çizelge 1.1.** Bazı funguslar tarafından üretilen endüstriyel açıdan önemli ürünler [10–13]

<b>Antibiyotikler ve Diğer Biyoaktif Bileşikler</b>		
<b>Ürün</b>	<b>Üretici Mikroorganizma</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
Penisilinler	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium notatum</i>	Antibiyotik
Sefalosporinler	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Antibiyotik
Griseofulvin	<i>Penicillium urticae</i> <i>Penicillium griseofulvin</i>	Antibiyotik
Ergot Alkaloidler	<i>Claviceps purpurea</i>	Uterus Kaslarının Suni Kasılması
Siklosporin	<i>Tolypocladium inflatum</i>	İmmün Baskılama
Mevalonin	<i>Aspergillus terreus</i>	Antibiyotik
Siksanin	<i>Helminthosporium siccans</i>	Antibiyotik
Fumagillin	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Antibiyotik
Fusidik asit	<i>Fusidium coccineum</i>	Antibiyotik
<b>Organik Asit Üretimi</b>		
<b>Ürün</b>	<b>Üretici Mikroorganizma</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
Sitrik Asit	<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida lipolytica</i>	Besin ve İlaç Endüstrisi
Fumarik Asit	<i>Rhizopus spp.</i>	Besin Endüstrisi
Glukonik Asit	<i>Aspergillus niger</i>	Besin ve İlaç Endüstrisi
İtakonik Asit	<i>Aspergillus terreus</i>	Kimya Endüstrisi (plastikler)
<b>Biyokütle Üretimi</b>		
<b>Üretici Mikroorganizma</b>	<b>Kullanım Alanı</b>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Besin (fırıncılık)	
<i>Fusarium graminearum</i>	Besin (protein)	
<i>Candida utilis</i>	Hayvan Besini	
<i>Agaricus bisporus</i>	Besin	
<i>Volvariella volvacea</i>	Besin	
<i>Lentinula edodes</i>	Besin	
<i>Paecilomyces sp.</i>	Hayvan Besini	
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Hayvan Besini	
<i>Beauveria bassiana</i>	Biyolojik kontrol	
<i>Verticillium lecanii</i>	Biyolojik kontrol	

**Çizelge 1.2.** Bazı funguslar tarafından üretilen endüstriyel açıdan önemli enzimler [10–12]

Ürün	Üretici Mikroorganizma	Kullanım Alanı
$\alpha$ -Amilaz	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Besin ve İçecek Endüstrisi
Amiloglukozidaz	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus foetidus</i> <i>Aspergillus awamori</i> <i>Rhizopus</i> sp.	Besin ve İçecek Endüstrisi
Asparajinaz	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium camembertii</i>	İlaç Endüstrisi
Selülaz	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Humicola insolens</i> <i>Penicillium funiculosum</i>	Besin Endüstrisi
Glukoz oksidaz	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Besin Endüstrisi
$\beta$ -Galaktozidaz	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus foetidus</i> <i>Saccharomyces fragilis</i>	Besin ve Süt Endüstrisi
İnvertaz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Besin Endüstrisi
Lipaz	<i>Aspergillus oryzae</i>	Besin ve Süt Endüstrisi
Nükleazlar	<i>Penicillium citrinum</i>	Besin (tat)
Pektinazlar	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Humicola insolens</i>	Besin Endüstrisi
Proteinaz	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor miehei</i> <i>Mucor pusillus</i> <i>Aspergillus melleus</i> <i>Rhizopus delemar</i>	Besin ve Süt Endüstrisi (peynir)
$\beta$ -glukanaz, Glukoamilaz	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus phoenicis</i> <i>Rhizopus niveus</i>	Hayvan Besini Endüstrisi Besin Endüstrisi
Laktaz	<i>Aspergillus niger</i>	Besin ve Süt Endüstrisi
Proteazlar	<i>Aspergillus</i> sp.	Besin, Deterjan ve Biyomedikal Endüstrileri
Dekstranaz	<i>Penicillium</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	Besin Endüstrisi
Rennin	<i>Mucor miehei</i> , <i>Mucor pusillus</i>	Besin ve Süt Endüstrisi (peynir)
Lakkaz	<i>Coriolus versicolor</i>	Besin, Tekstil, Kağıt, Kozmetik Endüstrileri

Bazı filamentli funguslar peyniri daha lezzetli hale getirmek için kullanılırken, bazıları de Asya kültürlerinde sufu, tempoh ve miso gibi gıdaları üretmek için kullanılır. Funguslar gıda endüstrisinde lezzet artırıcı, renklendirici ajan ve et benzeri protein katkısı olarak kullanılabilir [10]. Örneğin düşük enerji ve kolesterol içeriğinden dolayı diyetisyenler ve sağlığına dikkat eden tüketicilerin beğeni ile kullandıkları Quorn *Fusarium graminearum*' dan elde edilen bir mikrobiyal proteindir [10, 14, 15].

Filamentli funguslar ve bira mayaları kortizon gibi tıbbi açıdan önemli bileşikleri dönüştürmek veya modifiye etmek amacıyla da kullanılabilir [10]. Örneğin transgenik *Saccharomyces cerevisiae* türünden interferon, serum albumin ve çeşitli aşılarda elde edilebilmektedir [11].

Bu türde gelişmeler fungusların kullanıldığı tarım ve çevre biyoteknolojisinde ayrıca geleneksel fermentasyon biyoteknolojisinin dışında bulunan endüstriyel biyoteknolojide de gerçekleşmektedir. Tarım biyoteknolojisinde çalışmalar zararlı böcek, yabancı ot, bitki patojeni mikroorganizma popülasyonlarını azaltacak funguslar oluşturma yönündedir. Benzer çalışmalar ürün gelirini artırmak amacıyla aşı olarak mikorizaları kullanarak gerçekleştirilir. Funguslar endüstriyel alanlarda kömürün çözünür hale getirilmesinde, kağıt hamurundan lignin gideriminde ve çözümlerden metal iyonlarının, çözünmeyen maddelerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Çevre biyoteknolojisinde fungusların kullanımı siyanit gibi tehlikeli atıkların arıtımını, pestisitler ve diğer kimyasal bileşiklerle kirlenmiş toprakların biyolojik iyileştirilmesini amaçlayan teknolojilere bağlıdır [10].

### 1.3. Çürükçül Funguslar

Bu funguslar odunun yapıtaşı olan selüloz, hemiselüloz ve lignin tabakasını yıkararak oluşan ürünleri besin olarak kullanmaktadır [1].

Selüloz odunun kuru ağırlığının %38–50' sini, hemiselüloz %23–32' sini, lignin ise %15–25' ini oluşturmaktadır [16].

Selüloz yüksek yapılı bitkilerin hücre duvarlarının temel yapısal maddesidir. Selüloz  $\beta(1:4)$ -glikozidik bağlarla bağlı glukoz moleküllerinin oluşturduğu doğrusal bir polimerdir [17–19]. Doğal selüloz güçlü, fibrilli ve uzun glukoz zincirlerinden dolayı hidrolize karşı dirençli olup, selülaz enzimleri ile monomerlerine ayrıştırılır [15, 19]. Bu polimerde tekrar eden ana birim sellobiyozdur. Selüloz molekülü suda çözünmez ve yüksek bir gerilme gücüne sahip olup, nispeten nişasta gibi diğer glukoz polimerlerine

kıyasla mikrobiyal yıkıma karşı daha dirençlidir. Hemiselüloz selülozun aksine bir homopolimer olmayıp, farklı moleküler yapıda monomerik birimlerden oluşan kompleks bir yapıdır [17]. Genellikle 200 şeker uzunluğunda selülozdan çok daha kısa zincirler oluştururlar [15]. Ligninle birlikte selülozu çevreleyen şekilsiz bir tabakayı oluşturur [17, 19].

Hemiselülozlar pentozlar (arabinoz ve ksiloz) veya heksozlardan (D-glukoz, D-mannoz ve D-galaktoz) oluşur. Hemiselülozlar yüksek oranda dallanmış ve kristal olmayan polimerler olduğundan hemiselülozun enzimatik yıkımı kolaydır. Pek çok mikroorganizma lignoselülozun hemiselüloz katmanını ya doğal yapısıyla ya da hidroliz ettikten sonra kullanabilir [18].

Lignin tüm yüksek yapılı bitkilerde bulunan ve mikrobiyal saldırıya karşı bir bariyer olarak hizmet eden, su geçirmeyen aromatik bir polimerdir. Odunun en dış katmanını oluşturan lignin  $10^5$  Daltona ulaşan moleküler ağırlıkta şekilsiz, heterojen bir fenilpropanoyit polimeri olup, bu tabaka selülozu kimyasal ve enzimatik yıkımdan korumaktadır. Doğrusal ve düzenli tekrar eden ünitelerden oluşan nişasta veya selüloz gibi diğer polimerlerin aksine lignin tekrar etmeyen birimlerden oluşur ve üç boyutlu bir yapıya sahiptir [17, 20].

Selüloz ve hemiselülozdan tamamen farklı bir yapı sergileyen lignin, selüloz ve hemiselüloz ile iç içe yerleşim gösteren bir katmandır. Üç aromatik alkol olan kumaril alkol, kumaril alkolün metoksi sübstitlenmiş türevleri olan sinapil ve koniferil alkoller fenil propanoyit alt ünitelerini oluşturan en yaygın monomerlerdir. Bu monomerler gelişigüzel olarak birbirlerine bağlanarak asimetrik bir ağ yani lignin tabakasını oluştururlar [15].

Bitki hücre duvarında bulunan lignin, hücreleri birbirine bağlar. Ayrıca lignin bitkilerde mekanik ve biyokimyasal strese karşı direnç sağlarken, antioksidan özelliklere de sahiptir. Yangında bitkinin yanmasını geciktirici özelliğe sahip lignin bitkinin ultraviyole ışınlarına karşı korunmasını da sağlar. Bitkide pek çok önemli görevi üstlenen lignin tabakası suyu geçirmeme, neme karşı yanıt, su dengesi ve su taşınımı gibi su ile ilişkili fonksiyonlara da yardımcı olur [17].

Dayanıklı ve koruyucu lignin tabakası ile bitkinin özünde depolanan fungitoksik bileşikler odunun funguslar tarafından çürütülmesini engelleyen faktörlerdir. Ancak bütün bu engellere rağmen odunsu dokular funguslar tarafından yıkılabilir.



Çürükçül funguslar odunun yapısında bulunan hücre duvarlarına atakta bulunma şekillerine göre 3 grupta sınıflandırılabilir.

- I. Kahverengi çürükçül funguslar,
- II. Yumuşak çürükçül funguslar,
- III. Beyaz çürükçül funguslar [21–25].

### 1.3.1. Kahverengi çürükçül funguslar

Odunda çürümeye neden olan en büyük fungus grubu Basidiomycetes sınıfıdır. Bu Basidiomycetes' ler beyaz çürükçül ve kahverengi çürükçül funguslar olarak ikiye ayrılırlar. Taksonomik olarak birbirine oldukça yakın olan bu iki grup fungus bünyelerinde aynı cinsin üyelerini bulundurabilir. Kahverengi çürükçül funguslar esas olarak odunun selüloz ve hemiselüloz bileşenlerini yıkarken, lignin tabakasını sınırlı ölçüde etkileyebilmektedir [26].

Bu funguslar odun üzerinde gelişimleri esnasında odunda kahverengi ve tuğla şeklinde çatlaklar oluşturarak çürümeye neden olurlar. Kahverengi çürükçül terimi bu funguslar tarafından çürütülmüş odunun karakteristik rengi olan kahverengiden gelmektedir (Şekil 1.1) [21, 27].



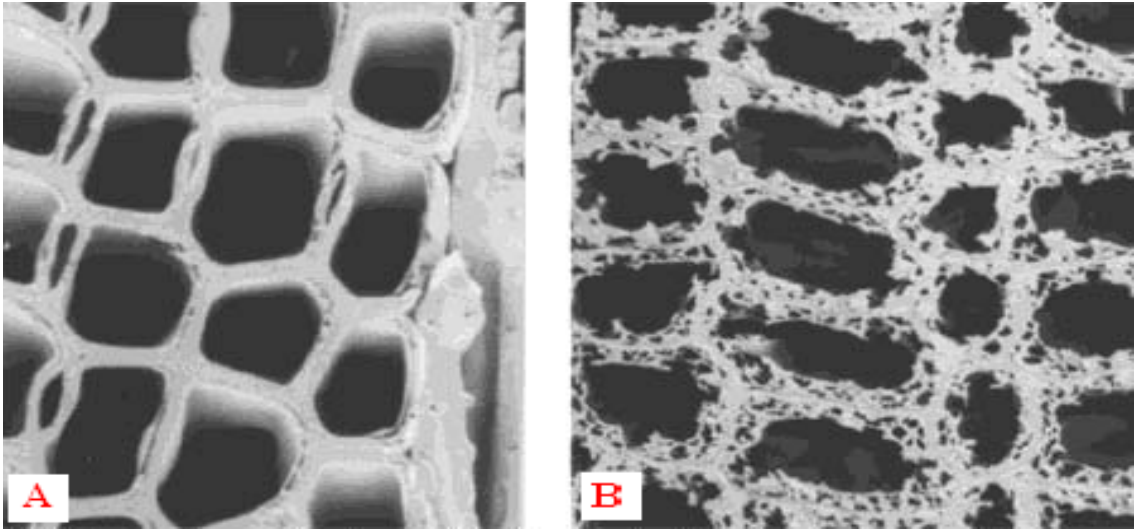
Şekil 1.1. Kahverengi çürükçül fungus tarafından çürütülmüş odunun şekli [28]

Kahverengi çürükçül fungus hifleri bir hücreden diğerine hücre çeperinde bulunan porlar aracılığıyla geçerek çürütme işlemini gerçekleştirirler. Kahverengi çürükçül funguslar genellikle *Schizophyllum commune*, *Fomes fomentarius* ve *Serpula lacrymans* gibi yaygın türleri içeren Basidiomycota üyeleridir [21]. Bu funguslar sıkı odunlu bitkilerden (Angiospermiler=Kapalı Tohumlu Bitkiler) ziyade yumuşak odunlu bitkilere (Gymnospermiler=Açık Tohumlu Bitkiler) daha fazla atakta bulunur [26]. Bu atak sonucunda odunun selüloz ve hemiselüloz bileşeni tamamen parçalanırken, lignin bileşeni kısmen parçalanır ve geriye kimyasal olarak modifiye olmuş kahve renkli lignin kalır [21, 29]. Kahverengi çürükçül fungusların hifleri odunda nadiren bulunur. Bu funguslar hemiselüloz tabakasını parçalarken, selüloz tabakasının yıkımı salgılanan selülaz enzimleriyle değil hemiselüloz tabakasının yıkımı esnasında üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksidatif olarak gerçekleştirilir. Bunun nedeni kahverengi çürükçül funguslar tarafından salgılanan selülaz enzimlerinin yumuşak çürükçül funguslardakinin aksine selüloz tabakasına kadar difüze olamamasıdır. Küçük bir molekül olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> odunu oluşturan hücrelerin duvarlarına difüze olarak genel bir çürümeye neden olur. Bu tipte bir atak odundaki kısıtlı azot kaynaklarını kullanmada etkili bir yoldur. Çünkü bu tip yıkım işlemlerinde yüksek miktarlarda ekstraselüler enzimlerin salgılanmasına ihtiyaç yoktur [21].

### **1.3.2. Yumuşak çürükçül funguslar**

Yumuşak çürükçül funguslar nemli ortamlardaki ağaçlar üzerinde gelişirler. Bu funguslar çitlerde, telgraf direklerinde, ahşap pencere çerçevelerinde, keresteden yapılmış soğutma kuleleri ile nehir veya deniz ortamında bulunan odunsu yapılarda gelişerek çürümeye neden olur. Bu fungusların hifleri odunu oluşturan hücrelerin lümenlerinde gelişir ve iyi bir yayılma gösterdikten sonra ilk olarak lignin tabakasına daha sonra da selülozca zengin olan tabakaya ulaşır ve selülaz enzimlerini salgılar. Bu enzimlerin difüzyonu hücre duvarının içerisinde paralel kenarlı boşluklar şeklinde çürümeye neden olur [21]. Yani bu gruptan bir fungus tarafından etkilenen odun; ıslak, sünger gibi yumuşak ve çukurlu görünür (Şekil 1.2) [30].

Bu durum fungus öldüğünde bile devam eder. Yumuşak çürükçül funguslar odunun selüloz ve hemiselüloz bileşenini tamamen parçalarken, lignin bileşenini tamamen olmasa da kahverengi çürükçül funguslara göre daha ileri basamaklara kadar yıkabilirler. Tüm yumuşak çürükçül funguslar odunu çürütebilmek için nispeten yüksek azot seviyelerine ihtiyaç duyarlar. Eğer bu azot odundan elde edilemezse gerekli azot odunun toprakla temas ettiği bölgelerden temin edilir. Birkaç Ascomycota ve karasal ortamlarda gelişen *Chaetomium* ve *Ceratocystis* gibi mitosporik türler ile deniz ve nehir ortamlarında gelişen *Lulworthia*, *Halosphaeria* ve *Pleospora* türleri yumuşak çürükçül funguslar grubuna ait organizmalardır [15].



**Şekil 1.2.** Çürütülmemiş odunun (A) ve yumuşak çürükçül fungus tarafından çürütülmüş odunun (B) taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiş şekli [31]

### 1.3.3. Beyaz çürükçül funguslar

Beyaz çürükçül funguslar ölü ağaçlar üzerinde gelişen ökaryotik mikroorganizmalardır [32].

Bu funguslar Basidiomycetes sınıfına dahil olup, odunun bütün bileşenlerini (selüloz, hemiselüloz ve lignin) parçalayarak, parçalanma sonunda odunda beyaz renkli bir kalıntı oluşumuna neden olurlar (Şekil 1.3) [33–35].

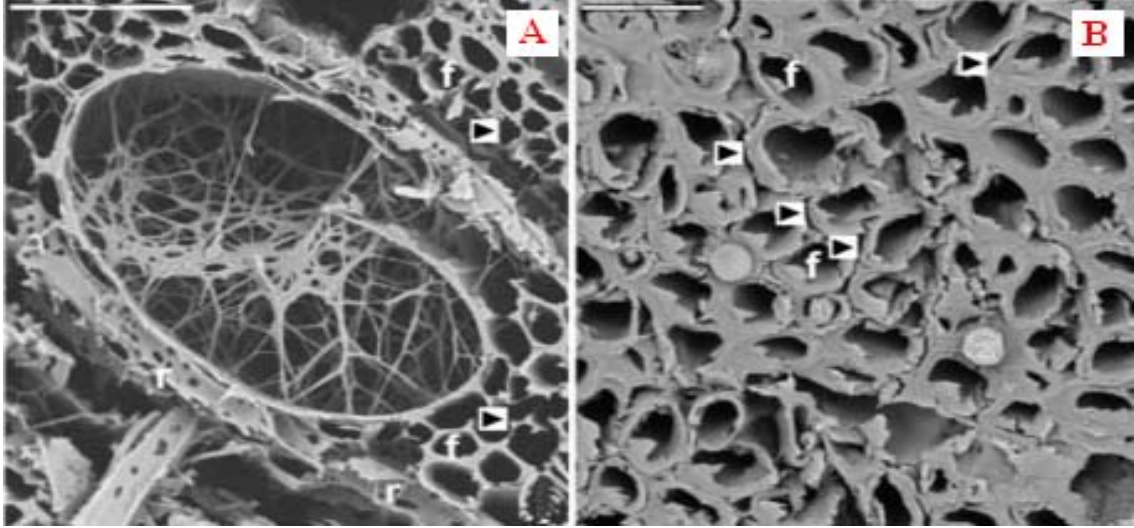


**Şekil 1.3.** Beyaz çürükçül fungus tarafından çürütülmüş odunun şekli [36]

Bu organizmalar odunun hidrolize edilemeyen lignin tabakasının yıkımı için geliştirilmiş kompleks enzimatik sistemler olarak düşünülebilir [32, 37]. Lignin selülozdan sonra en fazla bulunan yenilenebilir madde olduğu için ligninin biyolojik yıkımı üzerine yapılan araştırmalar oldukça fazladır [20]. Beyaz çürükçül funguslar lignin yıkımında kullanılabilir en uygun mikroorganizma grubudur [26, 32, 38, 39]. Kahverengi çürükçül funguslar ve yumuşak çürükçül funguslar substrat olarak selüloz ve hemiselülozu tercih ederler. Sadece beyaz çürükçül funguslar lignini CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya kadar yıkar [20].

Taramalı elektron mikroskopunda yapılan inceleme sonunda beyaz çürükçül fungus hücrelerinin U şeklinde demiryolu tüneline benzer bir kanal oluşturduğu ve bu kanal boyunca önce lignin daha sonra hemiselüloz ve son olarak da selüloz tabakasına ulaşarak yıkım işlemini gerçekleştirdikleri saptanmıştır [15].

Farklı beyaz çürükçül funguslar odunsu dokularda bulunan lignin ve karbonhidratlara farklı şekillerde atakta bulunmaktadır. Pek çok beyaz çürükçül fungus hücre lümeninde birikerek hücre duvarının aşınmasına neden olur. Aşınmış bölgeler fungus miselleri ile dolar. Bu tip çürümeye seçici olmayan veya eşzamanlı çürüme adı verilir (Şekil 1.4A). *Trametes (Coriolus, Polyporus) versicolor* kendiliğinden çürümeye neden olan tipik bir fungus türüdür [26]. Bazı beyaz çürükçül funguslar ise selülozu önemli oranda etkilemeden ligninin uzaklaştırılmasını sağlarlar ve odunda beyaz çukur veya beyaz benek tipi çürümeye neden olup, bu çürütme şekli seçici çürütme adını alır (Şekil 1.4B) [15, 26]. *Ganoderma applanatum* ve *Heterobasidion annosum* türü funguslar seçici çürümeye neden olan fungus türlerine en iyi örneklerdir. Seçici lignin yıkımını gerçekleştiren funguslar kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kullanılma potansiyelleri en yüksek olanlardır [26].



**Şekil 1.4.** Beyaz çürükçül fungus tarafından eşzamanlı (A) ve seçici olarak (B) çürütülmüş odunun taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiş şekli [40]

Lignin yıkım yeteneklerinden dolayı lignolitik funguslar olarak da adlandırılan beyaz çürükçül funguslar bu yıkımı sekonder metabolizmaları esnasında meydana gelen fenol oksidazlar (lakkaz ve peroksidaz), mangan peroksidaz, ligninaz (lignin peroksidaz), gibi ekstraselüler (hücre dışı) enzimler sayesinde gerçekleştirirler [26, 41, 42].

Bu enzimlerden biri, iki tanesi veya hepsi bir fungusta bulunabilir [1]. Örneğin beyaz çürükçül funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* ligninaz, mangan peroksidaz gibi enzimleri üretirken lakkaz enzimini üretmez. Bununla birlikte sınırlı sayıda çalışmada bu fungusun lakkaz ürettiği rapor edilmiştir [43].

Beyaz çürükçül funguslar fenolik yapıdaki lignini yıkabiliyorsa diğer fenolik yapıdaki maddeleri de yıkabilir, yapılan çalışmalar da bu düşüncüyü desteklemektedir [1]. Bu funguslar klorlu aromatik bileşenler, heterosiklik aromatik hidrokarbonlar, çeşitli boyalar ve sentetik polimerler gibi etkili çevre kirleticilerinin yıkımını gerçekleştirebilir. Bu yıkım işlemi beyaz çürükçül fungusların sahip olduğu güçlü oksidatif aktivite ve düşük substrat özgüllüğüne sahip lignolitik enzimleri sayesinde gerçekleştirilir. Böylece beyaz çürükçül funguslar ve enzimleri sadece biyolojik olarak kağıt hamuru oluşturma ve biyolojik ağartma gibi endüstriyel işlemlerde değil, biyolojik iyileştirmede de kullanılabilir [41, 26].

Beyaz çürükçül funguslar biyoteknolojide;

1. Bitkisel kütleden (saman, odun gibi) lignin gideriminde [43],
2. Biyolojik kağıt hamuru üretiminde [10, 44],

3. Ksenobiyotiklerin biyolojik iyileştirilmesinde [10, 45–48],
4. Poliaromatik hidrokarbonların yıkımında [49, 50]
5. Tekstil fabrikası atık sularının arıtımında [51, 52]
6. Alkol fabrikası atık sularının arıtımında [53, 54],
7. Zeytinyağı fabrikası atık sularının arıtımında [54–57],
8. Boyaların renginin gideriminde [58–62],
9. Ağır metallerin biyolojik adsorpsiyonunda [63, 64]
10. Kömürün sıvılaştırılmasında [65–67],
11. Mikrobiyal protein olarak [68],
12. Çeşitli enzimlerin üretiminde [1, 69–72],
13. Peyniraltı suyunun değerlendirilmesinde [73],
14. Hormon üretiminde kullanılabilmektedir [74].

#### **1.4. Beyaz Çürükçül Fungusların Lignolitik Enzimleri**

Beyaz çürükçül fungusların endüstriyel uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlayan 3 çeşit lignin yıkıcı (lignolitik) enzim bulunmaktadır. Bu ekstraselüler enzimler lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP) ve lakkaz enzimi (Lac) olup, buna ilaveten glioksal oksidaz (GLOX) ve aril alkol oksidaz (AAO) gibi enzimler de lignin peroksidaz ve mangan peroksidazın oksidan olarak ihtiyaç duyduğu hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ) üretimini gerçekleştirirler [20, 26].

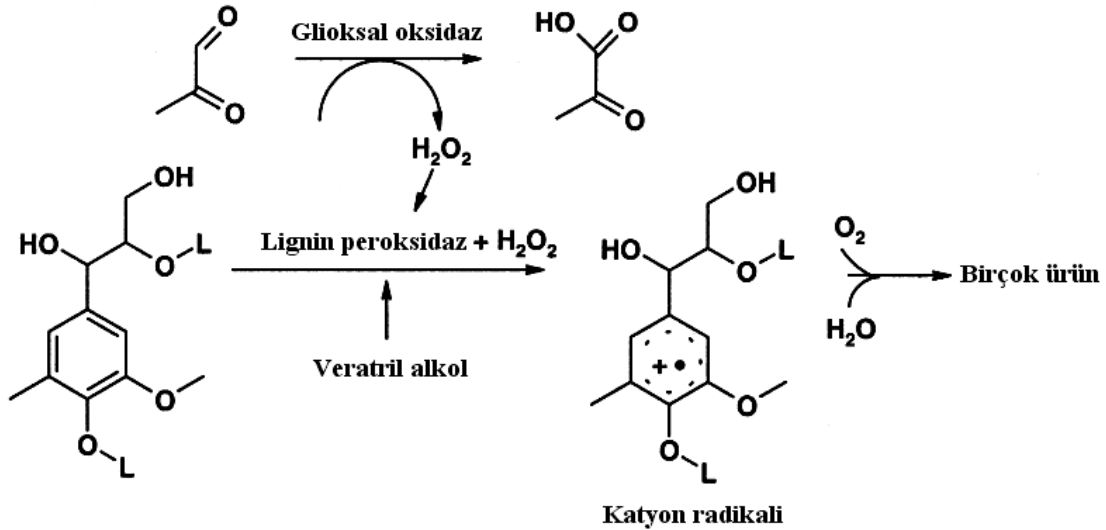
##### **1.4.1. Lignin peroksidaz (Ligninaz) (LiP, EC 1.11.1.14)**

Lignin benzeri bileşikler yıkan ve  $H_2O_2$  bağımlı bir enzim olan [75] lignin peroksidaz birçok beyaz çürükçül fungustan elde edilmiş olup, ilk olarak 1983 yılında *Phanerochaete chrysosporium*' un kültür sıvısında saptanmıştır [20, 26, 76].

Lignin peroksidazlar prostetik grup olarak iki kalsiyum iyonu ve bir demir protoporfirin IX içeren monomerik proteinlerdir. Lignin peroksidazlar 38 ile 43 kDa arasında moleküler ağırlığa sahiptir ve en uygun pH 2.5' de aktivite göstermektedir. Lignin peroksidazlar fenolik ve fenolik olmayan bileşiklerin oksidasyonunu katalizler [20]. Lignin peroksidaz lignine benzer yapıdaki bileşiklerin propil yan zincirlerinin C-C bağlarını oksidatif olarak parçalar ve tek elektron oksidasyonu ile substratını okside eder [77].

Veratril alkol *Phanerochaete chrysosporium* kültürlerinde üretilen sekonder bir metabolit olup, lignolitik enzimlerin indüksiyonunda rol aldığı düşünülmektedir. Lignin peroksidaz tek elektron transferi ile veratril alkolü oksitleyerek bir katyon radikali oluşumunu katalizlemektedir. Bu katyon radikali de daha sonra çözünmeyen lignin yapılarında katyon radikalleri oluşturan bir elektron transfer oksidantı gibi yani bir mediatör gibi hareket eder [26, 78].

Lignin peroksidazca katalizlenen tipik reaksiyonlar C $\alpha$ -C $\beta$  kırılması, C $\alpha$  oksidasyonu, alkil-aril kırılması, aromatik halka kırılımı, demetoksilasyon, demetilasyon, hidrosilasyon ve polimerizasyondur (Şekil 1.5). *Phanerochaete chrysosporium*' dan stabilite ve katalitik özellikleri farklılık gösteren 21 lignin peroksidaz izoenzimi izole edilmiştir [20].

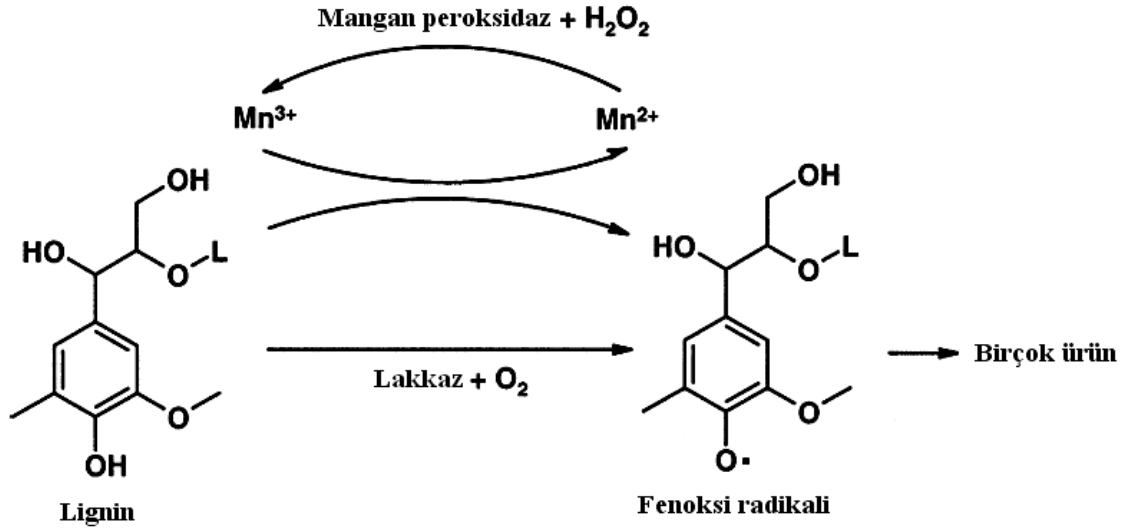


Şekil 1.5. Lignin peroksidaz ve glioksal oksidazın basitleştirilmiş reaksiyonları [26]

#### 1.4.2. Mangan peroksidaz (MnP, EC 1.11.1.13)

Kofaktör olarak mangana ihtiyaç duyan mangan peroksidaz ilk kez *Phanerochaete chrysosporium*' un kültür sıvısından elde edilmiştir [79, 80]. Glikoprotein yapısında olan ve prostetik grup olarak bir demir protoporfirin IX içeren, 43 ile 49 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip olan mangan peroksidazlar en uygun pH 4.0 ile pH 5.0 arasında aktivite göstermektedir. Mangan peroksidazlar fenolik ve fenolik olmayan bileşikleri bir elektron oksidasyonuna uğratabilmeleri için serbest mangan iyonlarına ihtiyaç duyarlar [20]. Mangan peroksidaz odunda ve toprakta bulunan Mn<sup>2+</sup> yi yüksek oranda reaktif olan Mn<sup>3+</sup> e oksitler. Mn<sup>3+</sup> ise düşük moleküler ağırlıklı mediatörler gibi davranıp fenolik lignin yapılarına saldırır (Şekil 1.6).

Mangan peroksidaz; ligninaz ve lakkaz ile birlikte ligninin biyolojik parçalanmasından sorumludur.



Şekil 1.6. Mangan peroksidaz ve lakkazın basitleştirilmiş reaksiyonları [26]

Mangan peroksidazın oksidasyon potansiyeli lignin peroksidazlardan daha düşüktür. Mn (II), mangan peroksidaz ya da lignin peroksidaz için gerekli bir bileşen değildir ancak bu enzimlerin üretiminin düzenlenmesinde önemli bir etkiye sahiptir. Beyaz çürükçül bir fungusun lignini başarılı bir şekilde yıkıma uğratabilmesi için hem fenolik hem de fenolik olmayan lignin bileşenlerine atakta bulunma kapasitesine sahip olması gerekir. Beyaz çürükçül fungusların tümü mangan peroksidazı üretmez. Bazı kaynaklara göre fenolik olmayan lignin bileşenlerinin yıkımında beyaz çürükçül funguslar tarafından üretilen esas enzimler lignin peroksidazlar iken, fenolik lignin bileşenlerinin oksidasyonunda farklı türlerde ya lakkaz ya da mangan peroksidaz görev alır. Örneğin *Trametes versicolor* lignin peroksidaz ve lakkaz salgılamak, *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz salgılar [26].

#### 1.4.3. Lakkaz (Lac, EC 1.10.3.2)

Lakkaz enzimi ilk olarak 1883 yılında Yoshida tarafından japon vernik ağacı *Rhus vernicifera*'nın öz suyundan elde edilmiş [81, 82] ve 1985 yılında da Bertrand tarafından metal içeren bir oksidaz olarak karakterize edilmiştir [82].



Lakkazlar (benzendiol: oksijen oksidoredüktaz, EC 1.10.3.2) *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces cyaneus* gibi bazı bakteri türleri [32], bazı böcekler, yüksek yapılı bitkiler ve funguslar tarafından üretilen çok bakırlı mavi oksidazlardır [20, 83–86].

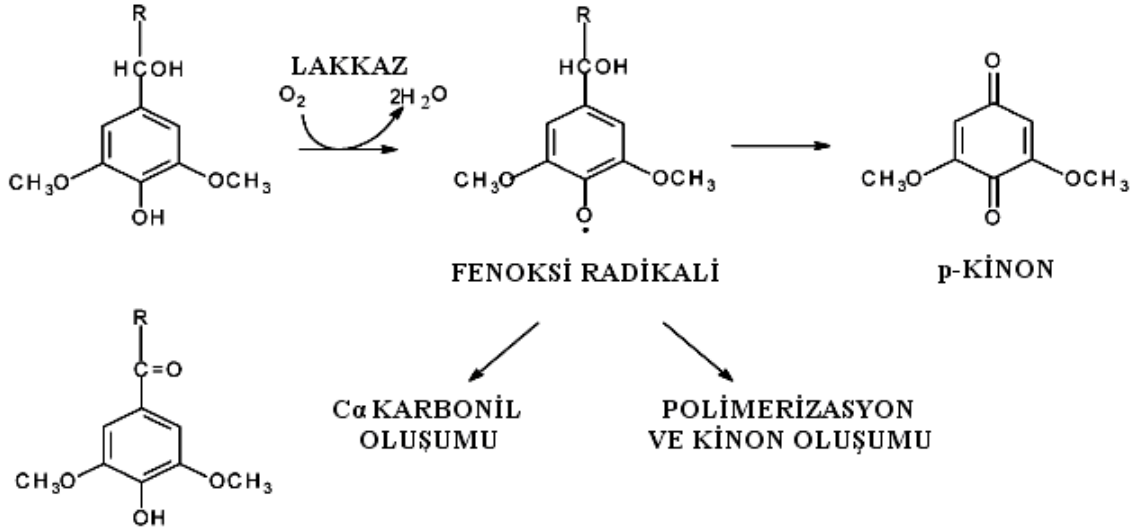
Lakkaz enzimi böceklerde kütikulanın sertleştirilmesinde ve *Bacillus* türlerinde ultraviyole ışınlarına karşı dirençli sporların yapısına katılmaktadır. Bitkilerde yaralanmalara karşı koruyucu özellik gösterirken, ayrıca hücre duvarı oluşumu ve peroksidazlarla birlikte lignin oluşumunda görev almaktadır [84, 85]. En çok çalışılan lakkazlar fungal kaynaklıdır [87, 88]. Fungal kaynaklı lakkazlar bazı Ascomycetes, Deuteromycetes ve esas olarak da Basidiomycetes üyelerinde tanımlanmıştır [32].

Fungal lakkazlar esas olarak lignin yıkımından sorumlu olup, bunun dışında morfogenez, pigmentasyon ve sporulasyon gibi fonksiyonlara sahiptir [82, 84, 88, 89]. Buna ilaveten bu enzimler fungal patojeni konak tarafından sentezlenen antifungal bileşikler olan toksik fitoaleksinlerden ve tanenlerden koruyarak bitkinin savunma sistemini etkisiz hale getirir ve birçok hastalıkta önemli bir virulans faktörü olarak görev alırlar [84, 85, 88]. Örneğin kök patojeni *Heterobasidion annosum*' un saldırganlığı lakkazın varlığına bağlıdır. Pek çok fungal türde hem konstitütif hem de indüklenbilir lakkaz varlığı saptanmış olup, bu enzimlerin genellikle sitoplazmadan köken aldığı ve daha sonra hücre dışına salgılandığı ifade edilmektedir [82].

Lakkazlar 60 ve 80 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip monomerik, dimerik veya tetramerik enzimlerdir. Lakkaz bütün mavi oksidazlar gibi glukoprotein yapısındadır. Lakkazların moleküler ağırlıkları elde edildiği kaynağa göre yüksek oranda değişiklik gösterir. Örneğin *Rhizoctonia solani* ve *Fusarium proliferatum*' da 4, *Botrytis cinerea*' da ise en az 3 farklı lakkaz saptanmıştır. Lakkaz üreten pek çok fungus türünde en az birkaç çeşit lakkaz bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar ile yeni lakkaz çeşitleri keşfedilmekte olup, aynı soylar tarafından üretilen enzimlerde bile moleküler ağırlık, optimum pH, substrat özgüllüğü ve diğer özellikleri açısından son derece farklılıklar gözlenebilmektedir. Bu değişiklik enzimin özellikle karbonhidrat bölgesinin miktarında veya içeriğinde meydana gelen farklılıklardan kaynaklanmaktadır [81, 82].

Enzimin karbonhidrat bölümü protein molekülünün ağırlıkça %10–45' lik kısmını oluşturur ve heksozamin, glukoz, mannoz, galaktoz, fukoz ve arabinoz gibi karbonhidratları içerir. Enzimin aminoasit zinciri yaklaşık olarak 500 aminoasit içermektedir. Lakkazlar genellikle pH 3.5 ile 7.0 arasında en yüksek aktivite göstermektedirler [81].

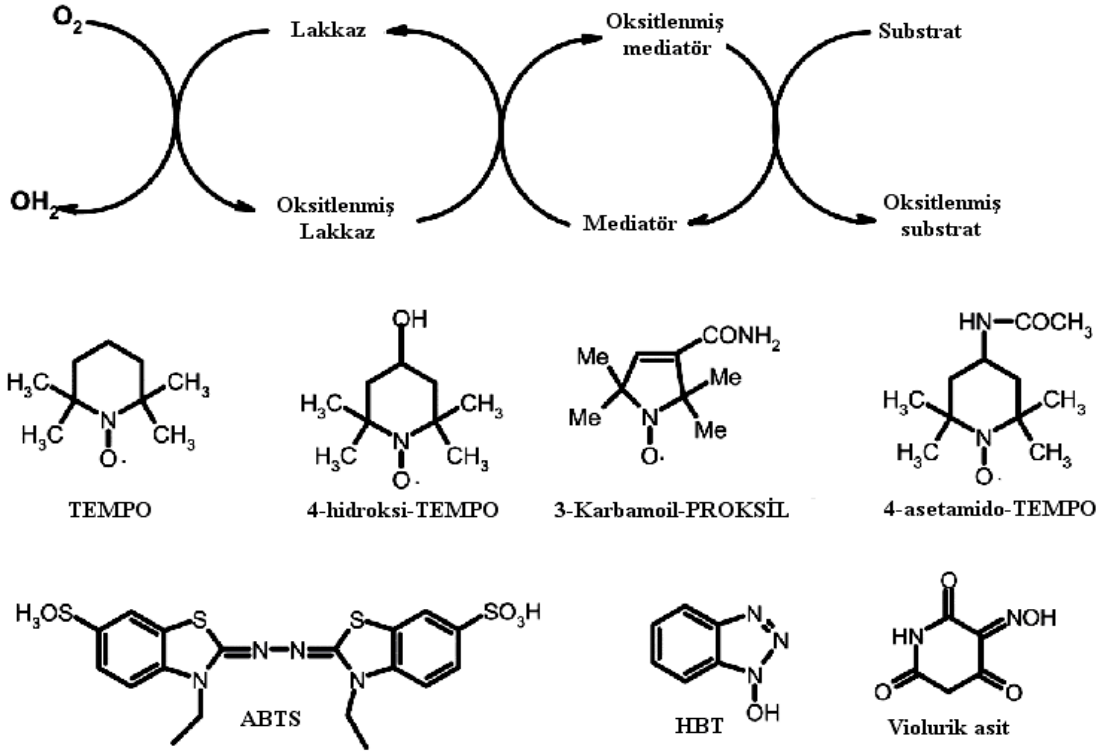
Lignin yıkımından sorumlu enzimlerden biri olan lakkaz fenolik lignin dimerlerindeki alkilfenil, C $\alpha$ -C $\beta$  bağlarının kırılması, demetoksilasyon, demetilasyon, polimerizasyon ve depolimerizasyon gibi reaksiyonları katalizler. [20]. Şekil 1.7 tipik bir lakkaz reaksiyonunu göstermektedir.



**Şekil 1.7.** Lakkazlar tarafından katalizlenen fenol oksidasyonunun şematik görünüşü [90]

Lakkaz enzimi lignindeki fenolik üniteleri fenoksi radikallerine oksitlerken, belli yardımcı substratların (mediatörlerin=aracıların) varlığında fenolik olmayan lignin alt birimlerini de oksitleyebilir [26, 91, 92]. Örneğin ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-sülfonik asit) [93, 94], HBT (hidroksil benzotriazol) [94, 95] veya violurik asit gibi yapay lakkaz substratları lakkazın oksitleyemediği fenolik olmayan bileşiklerin oksidasyonunda yardımcı substrat veya aracı olarak görev yapar ve oksidasyon reaksiyonunun gerçekleşmesini sağlar (Şekil 1.8) [93].

Bazı durumlarda doğal olarak sentezlenen bileşikler de aracı moleküller olarak görev alabilmektedir. Örneğin lakkaz üreten ancak mangan peroksidaz veya lignin-peroksidaz üretemeyen *Pycnoporus cinabarinus* beyaz çürükçül fungusunun fenolik olmayan lignin alt birimlerinin oksidasyonu için salgıladığı 3-hidroksi antranilat doğal bir aracı olarak görev yapmaktadır [26, 94, 96].

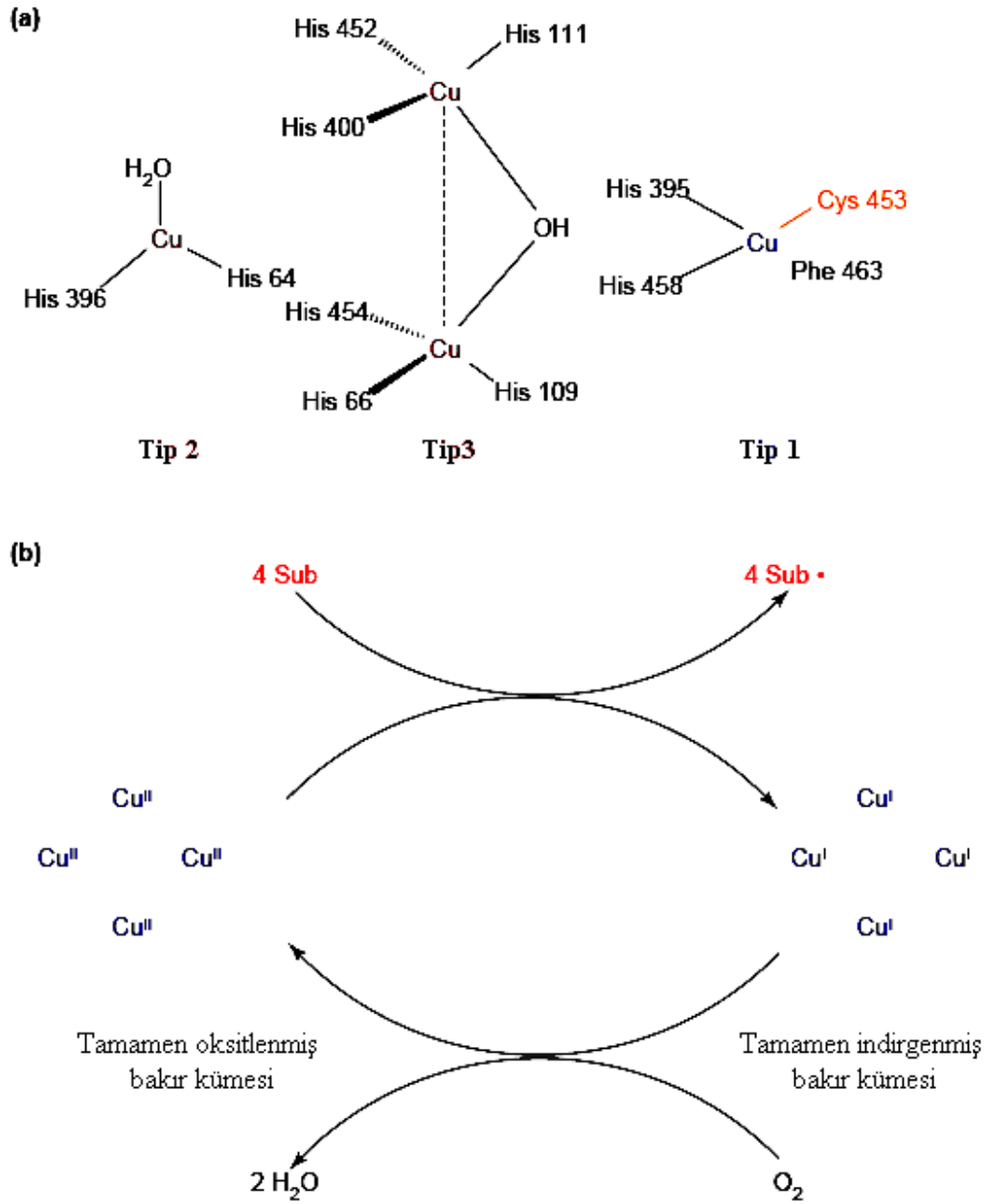


**Şekil 1.8.** Mediatör varlığında gerçekleşen lakkaz reaksiyonu ve bazı lakkaz mediatörleri [97]

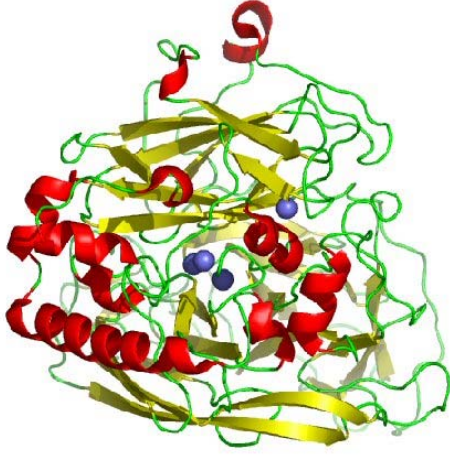
Lakkazların atakta bulunabildiği substrat dizisi oldukça geniş olup [82, 92], yapay veya doğal aracı bileşikler lakkaz enzimlerinin uygulama sahasını daha da genişletmektedir [93]. Bu enzimler mono-, di- ve polifenoller, aminofenoller, metoksifenoller, aromatik aminler, ve askorbat dahil çok çeşitli organik ve inorganik substratların bir elektron oksidasyonunu katalizler. Bu reaksiyon sonucunda moleküler oksijen dört elektron alarak suya indirgenir [32, 81, 92].

Enzimin aktif merkezinde bir sistein ve on histidin amino asiti ve bu amino asitlere bağlı  $Cu^+$  ve  $Cu^{++}$  formunda toplam 4 bakır atomu bulunmaktadır. Redoks işlemi enzimin katalitik çekirdeğini oluşturan bu dört bakır atomunun yardımı ile meydana gelir. Bu enzimlerin tipik mavi rengi Cu-Cu arasındaki bağların şiddetli elektronik absorpsiyonundan kaynaklanmaktadır. Lakkazlar tek çekirdekli ve üç çekirdekli olmak üzere iki bakır bölgesinden oluşur. Tek çekirdekli bakır bölgesinde tip-1 bakır (mavi bakır) bulunurken, üç çekirdekli bakır bölgesinde ise bir adet tip-2 bakır (normal bakır) ve iki adet de tip-3 bakır (birleştirilmiş çift çekirdekli bakır) bulunmaktadır (Şekil 1.9, 1.10).  $Cu^{++}$  atomunun bulunduğu tek çekirdekli bölgenin yakınında substratlar bir elektron oksidasyonu ile okside edilirken, elektronlar

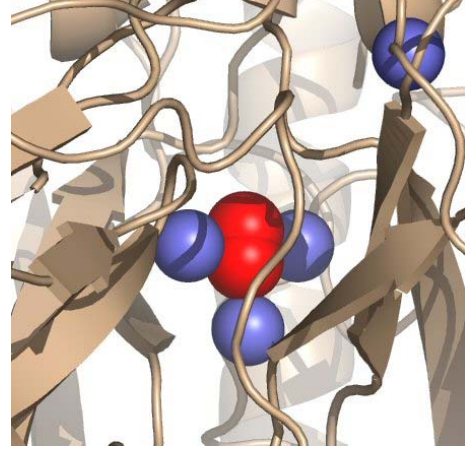
moleküler oksijenin indirgendiği üç çekirdekli bölgeye aktararak, oksijen üç bakır atomunun bulunduğu bu katalitik bölgede suya indirgenir. İndirgeyici bölgedeki mekanizma detaylı olarak bilinmese de katalitik döngünün sonucunda bir molekül oksijen iki molekül suya indirgenir ( $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2 H_2O$ ) ve dört substrat molekülünün oksidasyonu ile dört radikal oluşur. Bu reaktif ara ürünler daha sonra dimerleri, oligomerleri ve polimerleri oluşturur (Şekil 1.9) [84, 85, 98].



**Şekil 1.9.** Lakkaz enziminin katalitik bölgesinin yapısı ve katalitik bölgede gerçekleşen oksidasyon mekanizması [84]



**A**



**B**

**Şekil 1.10.** Lakkaz enziminin moleküler yapısının (A) ve katalitik bölgesinin (B) şematik görünümü [98]

## 1.5. Lakkaz Enziminin Biyoteknolojide Kullanım Alanları

### 1.5.1. Lakkaz enziminin kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kullanımı

Odunsu dokulardan lignin uzaklaştırılması kağıt hamuru ve kağıt endüstrisindeki öneminden dolayı yoğun olarak araştırılmaktadır [82]. Kimyasal olarak kağıt hamuru üretiminde ligninin yaklaşık %10' u hamur içerisinde kalır [20] ve kalan ligninin ya mekanik ya da kimyasal metotlarla uzaklaştırılması gerekir. Kimyasal olarak odun hamuru oluşturma işlemlerinde odun liflerine sıkıca bağlanmış olan lignin katmanını gidermek için güçlü kimyasallar kullanılır. Geleneksel olarak ağartma işleminde ortama klor, kloroksit ve oksijen ilave edilir [20, 84, 99]. Kağıt ve kağıt hamuru endüstrileri çevreye büyük hacimlerde koyu renkli atık sular boşaltmakta olup, bu atıksular kloroligninler, klorofenoller, kloroguaiakoller ve kloroalifatikler gibi klorlanmış lignin yıkım ürünlerini içermektedir. Klorlu organik bileşikler akut veya kronik olarak toksik olmalarının yanında mutajenik ve karsinojeniktirler [35]. Bu nedenlerle günümüzde Cl<sub>2</sub> kullanımı yasaklanmış, Cl<sub>2</sub>O kullanımı ise sınırlandırılmıştır. Buna göre ağartma işleminde yeni yaklaşımların geliştirilmesi gerekir. Alternatif bir yöntem olan biyolojik olarak kağıt hamuru oluşturma termomekanik olarak kağıt hamuru oluşturmadan önce oksidatif lignin yıkıcı fungal enzimler ile lignoselülozik maddelerin muamele edilmesi işlemidir. Kağıt hamurunun lignolitik enzimler ile ön muamelesi sonucu gerçekleşen lignin giderimi hem selülozun bütünlüğünün korunması hem de lignin giderim veriminin artırılması açısından faydalı olmaktadır [99]. Ayrıca bu biyolojik işlem hem

kağıdın dayanıklılığını artırmakta hem de enerji ve kimyasal kullanımını azaltarak çevresel etkiyi azaltmaktadır [20, 100]. Beyaz çürükçül funguslar lakkazlar gibi oksidatif enzimleri kullanarak lignin yıkımını gerçekleştirebilirler [82]. Ancak lignin oldukça büyük bir polimer olduğu için lakkaz enzimi ile direkt olarak etkileşime giremez [82, 84]. Kağıt hamurundan lignin gideriminde lakkazlar lignin içerisinde reaktif radikaller oluşturarak odun lifinde değişiklikler oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır [99]. Ligninin yıkılması işleminde enzimin aktif bölgesi ile lignin çekirdeği arasında sürekli hareket ederek redoks reaksiyonlarını gerçekleştiren ve lignin giderim verimini artıran küçük aracı moleküller oldukça önemlidir [82, 84].

Lakkaz gibi oksidatif enzimler kağıt hamuru üretiminde maliyeti azaltmada umut verici çözümler sağlamakla beraber gelecekte gelişmekte olan enzimlerle kağıt hamuru lifinin ve dolayısıyla son ürünün özelliklerini düzenleyerek eşsiz kağıt ürünleri imal etmek mümkün olabilir. Örneğin, lif yüzeyinin hidrofobitesi lakkaz enzimi aracılığıyla değiştirilebilir [101].

### **1.5.2. Lakkaz enziminin çeşitli atık suların muamelesinde kullanımı**

Ülkemizde zeytinyağı, boya, tekstil ve kağıt fabrikaları gibi çeşitli endüstriyel alanlarda faaliyet gösteren pek çok ticari işletme atık sularını herhangi bir arıtıma tabi tutmadan direkt olarak doğaya boşaltmakta, bu atık sular da gerek alıcı çevrede gerekse o çevrede bulunan çeşitli canlılar üzerinde son derece olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bazı işletmeler ise kimyasal yollarla atık sularını arıtmaktadır. Ancak arıtmada kullanılan kimyasalların kendileri de birer kirleticidir. Bu nedenle atık su arıtılmasında kullanılabilecek en akıllıca yöntem biyolojik arıtmadır [1].

Endüstriyel atık suların arıtımı amacıyla gerçekleştirilen biyolojik iyileştirme çalışmaları atık sularda bulunan fenol türevlerinin direkt olarak oksidasyonuna yönelik olup, [84] lakkazların hem fenolik hem de mikrobiyal yıkıma dirençli çevre kirleticileri gibi fenolik olmayan lignin benzeri bileşikleri oksitleyebilme özellikleri bu enzimlerin çeşitli biyoteknolojik işlemlerde kullanılmalarını olanaklı kılar [99]. Bu enzimler kağıt, kağıt hamuru, tekstil ve petrokimya gibi endüstriyel faaliyetler sonucunda oluşan endüstriyel atık suların yıkımı ve detoksifikasyonu gibi çalışmalarda yoğun olarak kullanılabilmektedir [26, 35, 95, 99, 102, 103].

Tekstil endüstrisi atık suları son yıllarda gittikçe artan oranlarda çevre kirliliğine neden olmaktadır [104]. Boya ve tekstil endüstrisi gibi alanlarda sentetik boyalar yaygın olarak kullanılır ve bu boyaların yaklaşık %10' u ciddi çevresel kirliliğe neden olan endüstriyel atık sularla çevreye salınır. Beyaz çürükçül funguslar tekstil boyası atıksularının renginin gideriminde kullanılabilir ve lakkazlar bu işlemde önemli bir rol oynar. Enzimatik muamele fungus kültürlerinin kullanımından daha basit ve daha etkilidir. Bu nedenle lakkazlar biyolojik ağartma için cazip bir tercih olmaktadır.

Yapılan bir çalışmada yeni bir ekstraselüler lakkaz kaynağı olarak kullanılan *Panus rudis*' in herhangi bir indükleyici kullanmadan önemli oranda lakkaz ürettiği saptanmıştır. Aynı çalışmada *Panus rudis*' ten elde edilen enzim saflaştırılmış ve kısmen de karakterize edilmiş ve çok küçük miktarda lakkazın sentetik boyaların rengini giderdiği saptanmıştır. Bu enzimin yüksek renk giderim yeteneği tekstil atık sularının arıtımında lakkaz enziminin kullanılabilceğini göstermektedir [105].

Endüstriyel alanlarda kullanılan bazı boyalar benzidin ve diğer aromatik bileşikler gibi karsinojenlerden yapılmakta olup, bu tür boyalara ait atık suların arıtımı için kullanılan mevcut yöntemlerin çoğu etkisiz ve pahalıdır. Bu nedenle endüstride kullanılan sentetik boyalar da dahil farklı kimyasal yapıdaki boyaları yıkma potansiyeline sahip lakkaz tabanlı işlemlerin gelişimi bu problemlere cazip bir çözüm olabilir. Bu nedenlerle tekstil endüstrisinde lakkaz enziminin kullanımı çok hızlı bir şekilde gelişmiş, lakkaz tekstillerin ve hatta sentezlenmiş boyaların ağartılması amacıyla kullanılmıştır. Novozyme (Novo Nordisk, Danimarka) 1996 yılında DeniLite adı altında aracı bir molekül ile biyolojik ağartma yapan ilk endüstriyel lakkaz enzimini kot kumaşları için kullanmıştır. Zytex (Zytex Pvt. Ltd., Bombay, Hindistan) şirketi de çok özgül olarak indigo boyasını yıkabilen ticari adı Zylite olan bir lakkaz aracı molekül sistemi geliştirmiştir [99].

Hammadde olarak şeker kamışını kullanan ve fermentasyon ile alkollü içecek üreten fabrikalar da çok miktarda ve koyu kahve renkli atık sularını sucul ekosistemlere boşaltmaktadır. Koyu kahve renk melanin pigmentinden kaynaklanmakta olup, bu pigment de hammaddenin ısıtılması sonucu şekerler ile amino bileşikler arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonu ile oluşmaktadır. Sucul ekosisteme boşaltılan bu koyu renkli atık su güneş ışığının su içerisine girişini engelleyerek fotosentezi engeller ve anaerobik koşulların oluşumunu sağlar. Bu atık su toprağa boşaltıldığında toprağı asidikleştirir ve tarımsal ürünleri olumsuz yönde etkiler. Birçok endüstriden çevreye verilen çeşitli atık sular renkli oldukları gibi bileşimlerinde sülfidler, sülfatlar, klorürler,

karbonatlar, sodyum hidroksit, peroksitler ve klorlu ağartma bileşikleri gibi çeşitli inorganik kimyasalları da içermektedir [35]. Lakkaz enzimi ile bu atık sulardaki boyar maddelerin yıkımı ve renginin giderimine yönelik çalışmalar yapılmaktadır [60].

Alkollü içecek üreten çeşitli ticari işletmelerin faaliyetleri sonucunda çevre kirliliğine neden olan atık sular oluşturulmakta ve çevreye boşaltılmaktadır. Örneğin alkol fabrikası atık suları (vinas) organik madde içeriği ve kahverenginden dolayı önemli bir çevre kirleticisidir.

Çevre açısından oldukça önemli bir diğer kirlilik kaynağı da zeytinyağı fabrikası atık suyu olup, zeytinyağı üretimi esnasında oluşturulan bu atık su Akdeniz bölgesindeki çevresel problemlerin başlıca kaynaklarından birisidir [99]. Zeytinyağı fabrikası atık suyu asidik karakterde olup, içerdiği koloidal fenolik maddeler nedeniyle bulanık morumsu kahverengi hatta siyaha yakın renktedir. Yüksek oranda organik ve inorganik madde içeren koyu renkli bu atık su sucul ortama verildiğinde suda renklenmeye yol açarak sudaki fotosentez ve solunum dengesini bozmaktadır [56]. Yüksek oranda fenol içeren bu atık sular nehirlerin yanında ya lağıma ya da toprağa boşaltılmaktadır. Ancak her iki durumda da atık suda bulunan fenol konsantrasyonunun etkili bir şekilde azaltılması gerekir. Yapılan çalışmalar alkol ve zeytinyağı fabrikası atık sularının arıtımı ve değerlendirilmesinde lakkaz enziminin ve lakkaz üreticisi beyaz çürükçül fungusların kullanılabileceğini göstermiştir [53–56].

Annibale vd. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada *Lentinus edodes*' ten elde edilen lakkazın tutuklanması ve zeytinyağı fabrikası atık suyu ile muamele edilmesi sonucunda hem kısmi bir renk giderimi hem de atık suyun polifenol ve *o*-difenol içeriğinde dolayısıyla da atık suyun toksisitesinde önemli bir azalma gerçekleşmiştir [106].

Yapılan bir çalışmada *Pleurotus ostreatus*' tan saflaştırılmış lakkaz ile zeytinyağı fabrikası atık suyunun fenolik içeriğinin büyük oranda (%90' a kadar) azaltıldığı ancak toksisitede azalma gerçekleşmediği rapor edilmektedir. Bunun dışında çok sayıda çalışmada zeytinyağı fabrikası atık suyunun lakkaz ve beyaz çürükçül funguslarla yıkıldığı rapor edilmiştir. Bu atık su funguslar tarafından lakkaz üretiminde kullanılabilmektedir [90].



### **1.5.3. Lakkaz enziminin çeşitli pestisit ve ksenobiyotiklerin biyolojik iyileştirilmesinde kullanımı**

Lakkazlar pek çok aromatik bileşiği oksitleyerek daha az toksik ürünlerin oluşumunu gerçekleştirirler. Lakkaz enzimi fenollerin, triklorofenollerin, organofosforlu pestisitlerin, karasal ve sucul ortamlarda yaygın olarak dağılım gösteren ve yüksek oranda mutajenik ve karsinojenik ksenobiyotiklerden olan benzo[ $\alpha$ ]pren gibi poliaromatik hidrokarbonların toksisitesini giderebilen bir enzimdir [107]. Bu enzimin benzoprenin yanısıra dioksinler gibi yüksek oranda toksik ksenobiyotiklerin yıkımını gerçekleştirdiği rapor edilmiştir [108].

Diğer ksenobiyotiklerle birlikte doğal petrol yataklarından ve fosil yakıtların kullanımından ortaya çıkan polisiklik aromatik hidrokarbonlar toprak kirliliğinin ana sorumlusudur. Bu bileşiklerin yıkımı çevre açısından önemlidir ve lakkaz enziminin katalitik özellikleri bu tip bileşiklerin yıkımı için kullanılabilir [20, 38, 99, 109].

Lakkaz enzimi herbisitleri de yapısal değişikliğe uğratarak inaktif analoglarına dönüştürebilmektedir. Reaksiyon ortamına mediatör olarak ABTS eklenmesiyle biyolojik yıkım daha da fazla gerçekleşebilmektedir [1].

TNT (2,4,6-trinitrotoluen) sık kullanılan ve çevre kirliliğine neden olan patlayıcı bir maddedir. Bu nedenle TNT' nin yıkımı ilgi çekici bir araştırma alanıdır. TNT yüksek toksisite ve mutajenite gösterdiğinden TNT yıkımı çevre güvenliği açısından çok önemlidir. Bakteriler ve funguslar tarafından TNT yıkımı ile ilgili çok sayıda çalışma vardır. Beyaz çürükçül fungusların lignin yıkıcı enzim sisteminin TNT yıkımını gerçekleştirdiği bilinmektedir [110].

### **1.5.4. Lakkaz enzimi geninin etanol üretim veriminin artırılması amacıyla klonlanması**

Lakkaz enziminin kullanım alanlarından biri de yenilenebilir ham materyallerden yakıt etanol üretiminin artırılmasıdır [111, 112].

Üretimi artırma çalışmalarında lignoselüloz hidrolizatlarında bulunan fenolik inhibitörlere karşı *Saccharomyces cerevisiae* 'nin direncini artırmak amacıyla *Trametes versicolor* ' un lakkaz sentezinden sorumlu genleri *Saccharomyces cerevisiae* ' ye aktarılmış [112] ve bu işlem sonucunda ortamdaki fermentasyon inhibitörleri olan

fenolik maddeler üretilen lakkaz enzimi ile yıkılmıştır. Yıkım işlemi sonucunda fenolik madde miktarı azalmasına bağlı olarak etanol üretim verimi de artmıştır [82].

#### **1.5.5. Lakkaz enziminin biyosensör olarak kullanımı**

Biyosensör; fizyolojik veya biyokimyasal bir değişim hakkında bilgileri saptayan, nakleden ve kaydeden bir cihazdır. Teknik olarak biyosensör biyolojik bir bileşen ile elektronik bir iletim sisteminin birbirini tamamladığı bir probdur. Bu prob biyokimyasal bir sinyali miktarı ölçülebilir bir elektriksel yanıtla dönüştürür. Enzimler, antikorlar, DNA, reseptörler, organeller, mikroorganizmalar, hayvan ve bitki hücreleri veya dokuları biyosensör yapımında kullanılabilir [90]. Lakkaz enzimi de biyosensör yapımında kullanılabilen enzimlerdendir [81, 90, 99, 72, 109, 113, 114].

Lakkaz ek kofaktör olmadan elektron transfer reaksiyonlarını katalizleyebildiği için çeşitli aromatik aminlerin [90, 99, 115] ve fenolik bileşiklerin [15, 90, 99, 116, 117] saptanmasında biyosensör olarak kullanılabilir. Ayrıca morfinin, kodeinin, kateşolaminlerin ve bitki flavonoidlerinin saptanması için de lakkaz tabanlı biyosensörler geliştirilmiştir [99]. Buna ilaveten bu enzim immunoprolar ve ilaç geliştirme gibi yeni uygulama alanlarını açacak biyosensör geliştirmede de kullanılmaktadır [92].

#### **1.5.6. Lakkaz enziminin gıda endüstrisinde kullanımı**

Lakkazlar besin veya içeceklerin rengini değiştirmek veya artırmak amaçlı yapılan işlemlerde kullanılabilir. Örneğin berrak meyve suyu, bira, şarapta oluşan esmerleşme, pus oluşumu ve bulanıklıktan sorumlu istenmeyen fenoliklerin ortadan kaldırılmasında lakkaz enzimi kullanılabilir [99, 109]. Lakkaz enzimi biranın tatsızlaşmasına neden olan bileşiklerin oluşumunu engellemek amacıyla biracılıkta kullanılmakta olup [118–120], lakkazın besin endüstrisindeki esas uygulamalarından biri de şarap stabilizasyonudur. Şıra ve şaraplar etanol, organik asitler, tuzlar ve fenolik bileşikler gibi farklı kimyasal bileşiklerin kompleks karışımlarıdır. Alkol ve organik asitler şarabın aromasını verirken, şarapların rengi ve tadı özellikle yapısında bulunan fenolik bileşiklerce belirlenir. Şarapta bulunan fenolik bileşiklerin bileşimi ve yüzdesi pek çok faktöre bağlıdır. Taze şarap tüketilmeden önce en az bir yıl boyunca depolanabilir ve bu depolanma esnasında şarabın yapısının değişmeden kararlı bir

şekilde kalması gerekir [90]. Ancak şarapta bulunan fenolikler şarabın yıllandırılması esnasında çeşitli değişimlere uğrarlar ve çeşitli kimyasal reaksiyonlarla birlikte bazı problemler ortaya çıkabilir [121]. Şaraplarda depolanma esnasında kompleks bir dizi reaksiyonlar gerçekleşir. Bu reaksiyonlarda polifenoller önemli bir rol oynar. Şıra ve şaraplarda bulunan demir, bakır ve çeşitli enzimler tarafından katalizlenen oksidatif reaksiyonlarda aldehitler, amino asitler ve proteinler bulanıklığa, rengin koyulaşmasına, aroma ve tat değişikliğine neden olur. Şaraplarda meydana gelen renksizleşme ve tat değişimini önlemek için fenolik grupların ortadan kaldırılmasında PVPP (Polivinilpolipirrolidon) ve oksitleyicileri engellemek için de kükürt dioksit gibi farklı metodlar kullanılmaktadır. Fizikokimyasal adsorbanlara alternatif olarak hedef polifenollere etki eden enzimler kullanılabilir [90]. Bu polifenoller enzimler tarafından oksitlenebilir [122], polimerize edilebilir ve daha sonra durultma işlemi ile uzaklaştırılabilir. Bu amaç doğrultusunda lakkaz enzimi kullanılabilir [90]. Yapılan bir çalışmada *Trametes versicolor* lakkazı kullanılarak, şarap stabilizasyonu amacıyla şıradan fenolik madde giderimi gerçekleştirilmiştir [123].

Lakkazlar fırıncılıkta kullanılan hamurda çapraz bağlar oluşturarak hamurun dayanıklılığını artırır [99, 124]. Si' ye göre fırıncılık ürünlerinde kullanılacak hamura lakkaz enziminin ilavesi ile hamurun bileşenleri oksitlenir ve hamur veya elde edilen ürün öncekine göre daha kararlı bir yapıya kavuşur. Özellikle bu amaçla lakkaz kullanımı sonucunda hamurun dayanıklılığı, kararlılığı artarken yapışkanlığı azalır ve böylece hamurun işlenilebilirliği de artar [90].

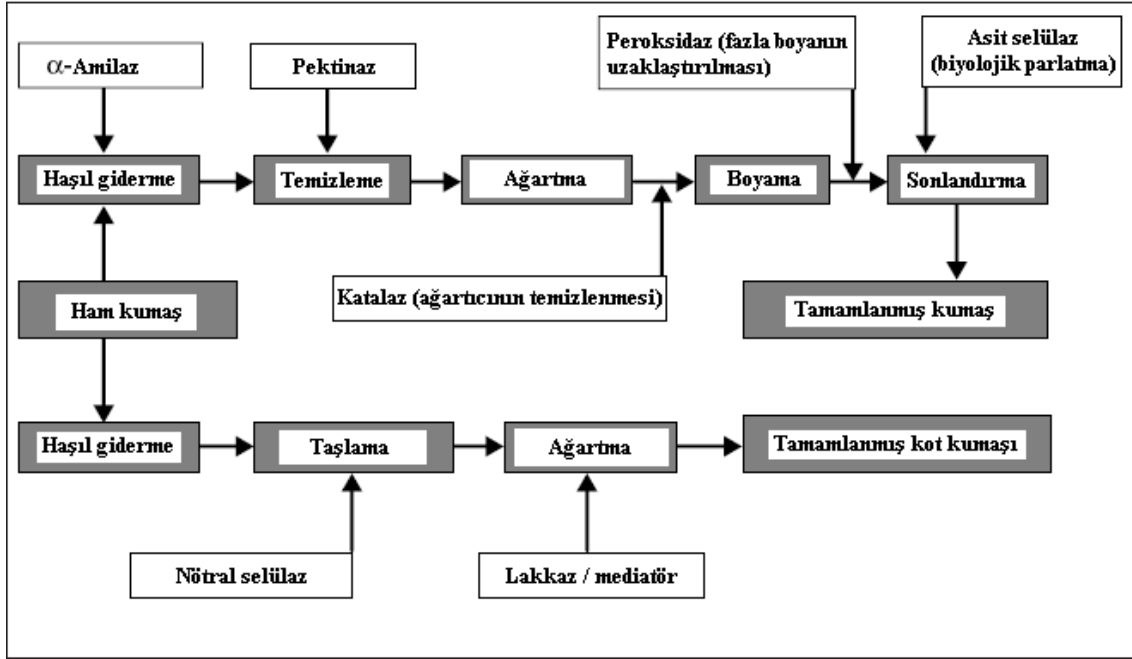
Yağlarda bulunan çözünmüş oksijenin ilave edilen lakkaz enzimi ile tüketilmesi sonucu yağın lezzeti artmaktadır. Kakao içeren çözeltilere *Coriolus versicolor*' dan elde edilen ham lakkaz enziminin ilavesi ile kakaonun lezzeti artmaktadır. Ayrıca bu uygulama ile çikolata üretiminde kullanılan kakaonun acılığı ortadan kaldırılmış olur. *Trametes villosa*' dan elde edilen lakkaz dilimlenmiş zeytin-su karışımına ilave edilmiş ve karışımda bulunan acı tadın yüksek oranda azaldığı saptanmıştır [90]. Ancak bu enzimin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğini geliştirmek için maliyetinin daha düşük olması gerekir. Bu nedenle hem lakkaz üretimi hem de immobilizasyon teknikleri üzerine daha fazla çalışma yapılması gerekir [90, 99].

### 1.5.7. Lakkaz enziminin tekstil endüstrisinde kullanımı

Boyar madde pazarının üçte ikisini tekstil endüstrisi kapsamaktadır. Bu endüstriler büyük hacimlerde su ve kimyasal tüketirler. Kullanılan kimyasal ayırıcılar inorganik bileşiklerden polimerlere ve organik ürünlere kadar çok farklı kimyasal bileşimde olabilir. Ticari olarak kullanılabilir 100.000' in üzerinde boya olup, yıllık olarak  $7 \times 10^5$  tonun üzerinde boyar madde üretilmektedir [99].

Kimyasal yapılarından dolayı boyalar ışığa, suya ve farklı kimyasallara maruz kaldıklarında solmaya karşı dirençlidirler ve sentetik kökenlerinden dolayı çoğunun renginin giderimi zordur. Benzidin ve diğer aromatik bileşikler gibi karsinojenlerden yapılan boyalar kaygı yaratmakta olup, boya atık suyunun arıtımı için kullanılan mevcut yöntemlerin çoğu etkisiz ve pahalıdır. Bu nedenle endüstride kullanılan sentetik boyalar da dahil farklı kimyasal yapıdaki boya yıkama potansiyeline sahip lakkaz tabanlı işlemlerin gelişimi bu problemlere cazip bir çözüm olabilir. Bu nedenlerle tekstil endüstrisinde lakkaz enziminin kullanımı çok hızlı bir şekilde gelişmiş, lakkaz tekstillerin ve hatta sentezlenmiş boya yıkama amacıyla kullanılmıştır. Novozyme (Novo Nordisk, Danimarka) 1996 yılında DeniLite adı altında aracı bir molekül ile biyolojik ağartma yapan ilk endüstriyel lakkaz enzimini kot kumaşları için kullanmıştır. Zytex (Zytex Pvt. Ltd., Bombay, Hindistan) şirketi de çok özgül olarak indigo boyasını yıkabilen ticari adı Zylite olan bir lakkaz aracı molekül sistemi geliştirmiştir [99, 125].

İndigo, tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılmakta olup, çevre kirliliğine neden olan biyolojik yıkıma dirençli bir maddedir [126]. Bu boya tekstil endüstrisinde özellikle kot kumaşlarının boyanmasında kullanılmakta olup, bazı kotların belirli bölgelerinde boyanın renginin açılması [127, 128] için taşlama yapılmaktadır. Her ne kadar taşlamanın amacı kotun belirli bölgelerinde indigo boyanın renginin açılması olsa da taşlama esnasında sürtünmeden dolayı kumaşta zedelenmeler gerçekleşmekte ve kotun kullanım süresi azalmaktadır. Lakkaz enzimiyle kotun belirli bölgelerinde indigo boyasının enzimatik olarak kısmi yıkımıyla kumaşta sürtünmeden dolayı meydana gelen tahribat ortadan kaldırılmış olacaktır [1]. Bu nedenle kot kumaşlarının ağartılmasında lakkaz enzimi kullanılabilir (Şekil 1.11) [109, 111, 129].



Şekil 1.11. Tekstil yaş işleme ve kot kumaşının ağartılmasında lakkaz kullanımı [131]

### 1.5.8. Lakkaz enziminin çeşitli boya renklerinin gideriminde kullanımı

Lakkazlar tarafından katalizlenen reaksiyonların fazla olması bu enzimin pek çok potansiyel uygulamalarda kullanılabilirliğini gösterir [87]. Tekstil, kağıt, kozmetik, farmasötik ve gıda endüstrilerinde sentetik boyalar gittikçe artan oranda kullanılmakta olup [87, 131], özellikle boya ve tekstil endüstrileri çevreye endüstriyel boyaları boşaltmaktadır. Toplam boya miktarının yaklaşık %10–15’ i atık sulara karışmakta olup, bunların bazıları da mikrobiyal yıkıma dirençlidir. Ayrıca bu boyalar anaerobik şartlarda karsinojenik bileşiklere de dönüştürülebilir. Azo boya gibi solmaya karşı dayanıklı boyalar çevrede oluşturdukları estetik hasarın yanında toksik ve karsinojenik oldukları için çevrecilerin esas endişe kaynağını oluşturmaktadır [43]. Kromofor tipine göre boyalar azo, antrakinon, akridin, arilmetan, siyanin, fitalosiyenin, nitro, nitrozo, kinonimin, tiazol veya ksantin boya olarak çeşitli sınıflara ayrılır [130].

Kimyasal olarak azo, antrakinon, heterosiklik, trifenilmetan veya fitalosiyenin boya şeklinde sınıflandırılan bu boyalar ciddi çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu boya renklerinin giderimi için adsorbsiyon, presipitasyon (çöktürme) gibi fiziksel yöntemler ile kimyasal yıkım ve fotodegradasyon gibi kimyasal yöntemler

kullanılmaktadır. Ancak hem fiziksel hem de kimyasal metotlar ile bu boya­ların renginin gideriminin yüksek maliyet gerektirmesi, uzun zamana gereksinim duyulması ve de çoğunlukla istenilen sonuca ulaşılamaması bu yöntemlerin dezavantajıdır [83].

Bu metotlara alternatif olarak lakkaz enzimi farklı yapıdaki pek çok boyanın renginin gideriminde kullanılabilir [46]. Yapılan bir çalışmada lakkaz ve aracı moleküller sisteminin boya­ların renginin giderimini artırdığı ve lakkaz yıkımına dirençli bazı boya­ların renginin giderildiği saptanmıştır [99]. Örneğin Kunamneni vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada *Myceliophthora thermophila*' dan elde edilen lakkaz enzimi tutuklanarak Reactive Black 5 (diazo boya), Remazol Brilliant Blue B (indigoid boya), Acid Blue 25 (antrakinonik boya), Acid Green 27 (antrakinonik boya), Methyl Orange (azo boya), Methyl Green (triarylmethane boya) olmak üzere toplam 6 sentetik boyanın renginin gideriminde kullanılmış ve renk giderimini artırmak amacıyla da redoks mediatörü olarak da ortama HBT ilave edilmiştir. Elde edilen sonuçlar redoks mediatörü varlığında bazı boya­ların renginin gideriminin arttığını göstermiştir [131].

Michniewicz vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada *Cerrena unicolor*' dan elde edilen hem saflaştırılmış hem de ham lakkaz enzimi ile antrakinon ve azo sınıfından boya­ların rengi giderilebilmiştir [132]. Yapılan diğer bir çalışmada *Panus rudis*' den elde edilen lakkaz enzimi saflaştırılmış ve küçük miktarda lakkazın sentetik boya­ların rengini giderdiği saptanmıştır. Bu enzimin yüksek renk giderim yeteneği tekstil atık sularının arıtımında lakkaz enziminin kullanılabileceğini gösterir [133].

S. R. Couto (2007) tarafından yapılan bir çalışmada da *Trametes hirsuta*' dan elde edilen ham lakkaz ile Direct black 168, Acid Red 119, Direct Blue 78, Acid Yellow 166 gibi çeşitli endüstriyel azo boya­larının renginin giderimi sağlanmıştır. Tekstil boyama tesislerinden çevreye boşaltılan atık sular içerisindeki azo boya­ları mikrobiyal yıkıma yüksek oranda dirençli olduğu için bu boya­ların renginin giderimi oldukça önemlidir. Azo boya­ların mikrobiyal yıkıma karşı dirençli olmalarının nedenleri sahip oldukları sülfonat grupları ve azo bağlarıdır. Bu iki özelliğinden dolayı ksenobiyotik olarak ifade edilen bu boya­ların bir kısmı veya türevleri mutajen veya karsinojen olabilmektedir [134].

### 1.5.9. Lakkaz enziminin diğ er endüstriyel alanlarda kullanımı

Biyoyakıt pilleri yakıt tüketmeden elektrik enerjisi sağ layan ve böylece daha temiz bir enerji kaynağı oluşturan son derece cazip yapılardır [99].

Lakkaz enzimi de küçük iletken sistemler gibi biyoyakıt pillerinin katot bölgesi üzerine tutuklanarak güç kaynağı olarak kullanılabilir [109, 135]. Lakkazlar biyoyakıt pillerinin katot bölümünden elektronları alabilen birkaç enzimden biri olup, yapılan çalışmalar lakkazların biyoyakıt pilleri ile birleştirmesine yöneliktir [107].

Gelecekte lakkazlar sentetik kimya alanında oksidatif yıkım, kompleks polimerlerin [130] ve tıbbi ajanların üretimi açısından büyük ilgi görebilecek enzimlerden biridir. Yapılan bir çalışmada Suberase (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Danimarka) adı verilen endüstriyel bir lakkaz kullanarak çeşitli fenolik renklendiriciler sentezlenmiştir [99].

Lakkazlar temizleyici ajan olarak su saflaştırma sistemlerinde kullanılabildiği gibi [99, 136], katalizör olarak anti-kanser ilaçlarının üretiminde [99] ve kozmetik ürünlerinde özellikle de saç boyalarında kullanılabilmektedir [103, 137].

Lakkaz tabanlı saç boyalarında kullanılan lakkazlar, oksitleyici ajan olarak bulunan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile yer değiştirdiği için yaygın olarak kullanılan boyalardan daha az tahriş edici olup, bu tür boyaların cilt ile temasında problem oluşturma riski çok daha azdır [109].

Cildin parlatılması için kullanılan kozmetik ve dermatolojik ürünlere lakkaz enziminin ilavesi de geliştirme aşamasındadır [99]. Ancak konstitütif olarak düşük seviyede üretilen lakkaz enzimlerinin [84] ticari uygulamalarının en önemli engeli yeterli enzim stoğunun bulunmaması ve redoks mediatörlerinin yüksek maliyetidir. Bununla birlikte ucuz ve fazla miktarda lakkaz üretimi için bu enzimin diğ er organizmalarda da ifade edilmesi, kimyasal yöntemlerle veya protein mühendisliği ile değişikliğ e uğratılarak daha sağlam ve aktif enzimler elde etmeye yönelik çalışmaların yapılması şarttır. Diğ er yandan lakkazın tutuklanması için etkili bir sistem geliştirilmesi de önemli bir konudur. Yapılan çalışmaların genel amacı, kararlı, uzun ömürlü ve düşük maliyetli katalizörler elde etmektir. Enzimin uygun bir substrata tutundurulması ve lakkaz aktivitesinin ömrünü uzatacak yeni tekniklerin geliştirilmesi ile istenen özelliklere sahip lakkaz elde edilebilir [99].

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Beyaz Çürükçül Fungusların Lakkaz Üretiminin Artırılmasına Yönelik Çalışmalar

Beyaz çürükçül funguslar tarafından üretilen lakkaz enzimi birçok fenolik bileşiği doğrudan, fenolik olmayan pek çok bileşiği de ABTS, HBT, violurik asit gibi yapay veya 3-hidroksi antranilat gibi doğal bir aracı molekül varlığında oksitleyebilmektedir. Bu lignolitik enzimin substrat özgülüğünün düşük olması enzimin kağıt, boya, tekstil, gıda ve kozmetik endüstrisi gibi farklı birçok endüstriyel alanda kullanımına imkan vermektedir. Ancak endüstriyel açıdan son derece yüksek bir kullanım potansiyeline sahip olan lakkaz enziminin üretimi yeterli değildir. Bu nedenle bazı araştırmacılar yeni lakkaz üretim yöntemlerinin veya lakkaz üreten yeni fungus türlerinin keşfi üzerine odaklanmışken, bazı araştırmacılar da çeşitli ağır metaller, bileşikler, karbon ve azot kaynakları, üreme ortamları, tarımsal atıklar ve atık sular kullanarak lakkaz üretimini artırmaya çalışmaktadır.

#### 2.1.1. Çeşitli ağır metallerin ve üretim metotlarının lakkaz üretimi üzerine etkisi

Bazı araştırmacılar lakkaz enziminin yapısında kofaktör olarak bakır atomlarının bulunmasını dikkate alarak bu enzimin üretimini artırmak için besiyeri ortamına çeşitli konsantrasyonlarda bakır ilave etmiş ve enzim aktivitesindeki değişimleri gözlemlemişlerdir. Bazı araştırmacılar da bakır dışında diğer ağır metallerin fungusun üremesi ve lakkaz üretimi üzerine etkisini gözlemleyebilmek amacıyla kültür ortamlarına çeşitli konsantrasyonlarda ağır metaller ilave ederek çalışmalar yapmışlardır.

Baldrian ve Gabriel (2002) enzim aktivitesinin artırılması açısından ağır metallerin önemli indükleyiciler olduğunu ve *Pleurotus ostreatus*' un üretildiği sınırlı azot içeren ortama  $Cd^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  ilavesinin lakkaz aktivitesini artırdığını rapor etmişlerdir [138].

*Pleurotus ostreatus* ile yapılan bir çalışmada kültür ortamına ilave edilen bakırın ekstraselüler proteaz aktivitesini azalttığı ve buna bağlı olarak kültür sıvılarındaki enzimin kararlılığının da arttığı ifade edilmektedir [139].



*Pleurotus ostreatus* 1804 soyu ile kesikli sistemde yapılan bir çalışmada fungus poliüretan köpük üzerine tutuklanmış, 72 saatlik inkübasyon süresinden sonra üreme ortamına 0.5–3 mM arasında artan konsantrasyonlarda  $\text{Cu}^{2+}$  ilave edilmiş ve 0.5' den 1.5 mM  $\text{Cu}^{2+}$  konsantrasyona kadar lakkaz aktivitesinde belirgin bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bakır ilave edilmemiş kültür ortamında lakkaz aktivitesi 324.1 U iken, 1.5 mM  $\text{Cu}^{2+}$  ilave edilen ortamda 420.3 U olduğu belirlenmiştir. Ancak 1.5 mM' in üzerinde mikrobiyal gelişimde meydana gelen inhibisyondan dolayı lakkaz üretiminin de azaldığı gözlemlenmiştir [140].

Janusz vd. (2006) tarafından *Rhizoctonia praticola* ile yapılan bir çalışmada kültür ortamına 0–300  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  ilave edilmiş ve fungus kesikli süreçte çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında yapılan enzim ölçümü sonucunda kontrol grubuna kıyasla enzim aktivitesinde belirgin bir artış gözlenmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesinin 5  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  ilave edilmiş kültür ortamında yaklaşık olarak 1000 nkat/L olduğu belirlenmiş olup, bu değer bakır ilave edilmemiş kültür ortamındaki lakkaz aktivitesinin yaklaşık 2.5 katıdır. Buna karşın bakır konsantrasyonu 10  $\mu\text{M}$ ' dan 300  $\mu\text{M}$ ' a doğru arttıkça lakkaz üretiminin baskılandığı gözlemlenmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 300  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  ortamında bu baskılamanın % 54 oranında olduğu saptanmıştır [141].

*Trametes versicolor* CCT 4521 ile yapılan bir çalışmada da kültür ortamına 0, 0.005, 0.02, 0.04, 0.07 ve 0.1 mmol  $\text{L}^{-1}$  bakır sülfat ve 1 mmol  $\text{L}^{-1}$  2,5-ksilidin ilave edilmiş ve 4–20 günlük inkübasyon periyotlarında enzim aktivitesi ölçülmüştür. En yüksek aktivite 12. günde 0.1 mmol  $\text{L}^{-1}$  bakır sülfat ilave edilen kültürlerde 40.774 U  $\text{L}^{-1}$  olarak elde edilmiştir [142].

Cavallazzi vd. (2005) *Lentinula edodes* UFV52' nin 2.6 ve 26 mM azot içeren kültür ortamlarına inokülasyondan 3 gün sonra 50  $\mu\text{M}$ ' lık artışlarla 0–300  $\mu\text{M}$  arasında  $\text{CuSO}_4$  ilave etmiş ve erlenleri karanlık ortamda 25 °C' de statik olarak inkübe etmişlerdir. İnokülasyondan 14 gün sonra en yüksek lakkaz aktivitesi 2.6 mM N ve 250  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  ilave edilmiş kültür ortamında yaklaşık 30 U/mL olarak belirlenmiştir [143].

Tychanowicz vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada *Pleurotus pulmonarius*' un katı substrat kültürlerine farklı oranlarda  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  ilave edilerek, bu ağırmetallerin üreme ve lakkaz üretimi üzerine etkisi test

edilmiştir. Ortama ilave edilen  $Ag^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  nin organizma için yüksek oranda toksik olduğu ve kültürlerde çok düşük düzeyde üreme gerçekleştiği ifade edilmekle birlikte  $Zn^{2+}$  nin de lakkaz aktivitesi üzerinde olumsuz etki gösterdiği saptanmıştır. Farklı kültür ortamlarına eklenen 15 mM konsantrasyonda  $Cu^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  lakkaz aktivitesinde artışa neden olurken, 4 mM  $Cu^{2+}$  nin ilavesi ile üremede ve lakkaz aktivitesinde gözle görülür herhangi bir değişiklik olmadığı rapor edilmektedir. Kültürlere 10–25 mM konsantrasyonlarda ilave edilen bakırın fungusun üremesini baskılamasına rağmen en yüksek aktivite 25 mM  $CuSO_4$  ilave edilen ortamda  $1420 U L^{-1}$  olarak tespit edilmiştir [144].

Lorenzo vd. (2006) de yapmış oldukları çalışmada lakkaz aktivitesini artırmak amacıyla batık fermentasyon koşulları altında üretilen *Trametes versicolor* CBS100.29 soyunun besiyeri olan arpa kepeğine ayrı ayrı 2 mM  $Cd^{2+}$ , 1 mM  $Ag^+$ , 1 mM  $Mn^{2+}$ , 1 mM  $Zn^{2+}$  ve 2 mM  $Cu^{2+}$  ilave etmişlerdir. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda  $Ag^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  nin lakkaz aktivitesini az miktarda artırdığı saptanmıştır. Araştırmacılar en yüksek enzim aktivitesinin 2 mM  $Cu^{2+}$  nin ilave edildiği kültür ortamlarında yaklaşık 6000 U/L olduğu ifade edilmektedir. Bu aktivite değeri de kontrol kültürlerinden elde edilen lakkaz aktivitesinin 9 katı olarak belirlenmiştir. Bakırın enzim aktivitesi üzerine oldukça etkili olması nedeniyle araştırmacılar kültür ortamına bu defa 2, 3.5 ve 5 mM konsantrasyonlarda  $Cu^{2+}$  ilave etmiş ve en yüksek aktivitenin 3.5 mM  $CuSO_4$  eklenmiş kültür ortamında yaklaşık olarak 8000 U/L olduğunu saptamışlardır [145].

Birhanlı ve Yeşilada (2006) tarafından yapılan bir çalışmada *Funalia trogii* ATCC 200800 ve *Trametes versicolor* ATCC 200801' nin katı ve sıvı besiyerlerine artan konsantrasyonlarda  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  eklenmiş ve bakırın belirli bir orandan sonra fungal üreme üzerine olumsuz etki gösterdiği rapor edilmiştir. Daha sonra kesikli süreçte *F. trogii* ve *T. versicolor* kültür sıvısına son konsantrasyonda 0, 0.5, 1 ve 2 mM olacak şekilde  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ilave edilmiş, kültürler 30 °C'de statik ve 150 rpm' de çalkalamalı olarak 5 gün boyunca inkübe edilerek lakkaz aktivitesi ölçülmüştür. *F. trogii*' nin statik inkübasyonunda en yüksek lakkaz aktivitesi 1 mM Cu ilave edilmiş olan kültür sıvısında 3.12 U/mL iken, *T. versicolor*' un statik inkübasyonunda en yüksek aktivite 0.5 mM Cu ilave edilmiş olan kültür sıvısında 2.34 U/mL olduğu saptanmıştır. Çalkalamalı inkübasyonda ise *Funalia trogii* için en yüksek aktivite 0.5 mM Cu ilave edilmiş olan kültür sıvısında 4.61 U/mL, *T. versicolor* için ise en

yüksek enzim aktivitesi 1 mM Cu ilave edilmiş olan kültür sıvısında 2.96 U/mL olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada tekrarlı kesikli süreçte *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin kültür sıvısına 0.5 mM Cu ilave edilmiş, peletler 30 °C ve 150 rpm’ de çalkalamalı olarak 10 gün boyunca inkübe edilmiştir. Her gün enzim aktivitesi ölçülmüş en yüksek lakkaz aktivitesi *Funalia trogii* için 6. günde 40.29 U/mL olarak saptanmıştır. Bu değerin aynı koşullarda inkübe edilen kontrol gruplarının en yüksek lakkaz aktivitesinin 40 katından daha yüksek bir değer olduğu belirtilmektedir. *Trametes versicolor* için ise en yüksek aktivitenin yine 6. günde 12.08 U/mL olduğu ve bu değerin kontrole kıyasla 15 kat yüksek olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen fungusların kültür filtratları ile ticari lakkaz üzerine de çeşitli konsantrasyonlarda bakır ilave edilmiş ve enzim ölçümü sonucunda lakkaz aktivitelerinde dikkate değer bir değişikliğin olmadığı gözlemlenmiş, dolayısıyla da bakırın lakkaz aktivitesinden ziyade lakkaz üretimi üzerine etkili olduğu sonucuna varılmıştır [72].

Rosales vd. (2007) *Trametes hirsuta*’nın katı substrat fermentasyonu ile üretimi için erlenler içerisine destekleyici substrat olarak çeşitli miktarlarda portakal kabuğu ve indükleyici madde olarak da farklı konsantrasyonlarda CuSO<sub>4</sub> ve şiringaldazin eklemiştir. Destekleyici substrat olarak 2.5 g portakal kabuğu içeren ortamlardan birincisine 1 mM bakır, diğerine ise 0.11 µM şiringaldazin ilave edilmiş ve en yüksek aktivitenin 1 mM bakır ilave edilmiş kültürlerin inkübasyonununun 14. gününde yaklaşık 20000 U/L olduğu saptanmıştır. Aynı fermentasyon sürecinde 250 mL’ lik erlenler içerisine yine 2.5 g portakal kabuğu ilave edilmiş ve bu ortamlara ayrı ayrı 1, 2, 3.5, 5 mM bakır ve 1 mM bakır ile birlikte 0.11 µM şiringaldazin ilave edilmiştir. En yüksek aktivitenin ise 5 mM bakır eklenmiş kültürlerde yaklaşık olarak 30000 U/L olduğu gözlemlenmiştir. Aynı çalışma portakal kabuğu miktarı 2 katına çıkarılarak tekrarlanmış ve en yüksek aktivitenin yine 5 mM bakır sülfat ilave edilmiş kültürlerde 19000 U/L olduğu saptanmıştır [146].

*Trametes versicolor*’un sıvı üreme ortamına 1 mM 2,5-ksilidin ile farklı konsantrasyonlarda CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ilave edilmesi lakkaz aktivitesini indüklemekte ve 20. günde 2,5-ksilidin ile beraber 0.4 mM CuSO<sub>4</sub> ilave edilmiş kültürlerde 12756 U/L enzim aktivite değerine ulaşılmaktadır [147].

Tunus' ta izole edilen *Trametes trogii*' nin kullanıldığı bir çalışmada kültür ortamlarına 75, 150, 300, 600 mM konsantrasyonlarda bakır ilave edilmiş ve fungus 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. İki gün aralıklarla yapılan ölçümler sonucunda en yüksek aktivitenin 300 mM bakır ilave edilmiş kültürlerde inkübasyonun 8. gününde yaklaşık olarak 20000 U/L olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar bu değerın kontrol gruplarından elde edilen lakkaz aktivitesinin 100 katından daha yüksek olduğunu ifade etmektedir. Aynı çalışmada kültür ortamlarına 150 µM MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O ilave edilmiş, ancak lakkaz aktivitesinde kontrole kıyasla düşük oranda artış gerçekleştiği gözlemlenmiştir [148].

Bir deniz fungusu izolatu olan NIOCC#2A' nın kullanıldığı bir çalışmada, statik olarak üretilen fungusun kültür ortamlarına inkübasyonun 6. gününde 2 mM CuSO<sub>4</sub> ilave edilmiş ve en yüksek aktivitenin inkübasyonun 21. gününde 83619 U/L olduğu saptanmıştır. Üreme ortamına 2mM CuSO<sub>4</sub> + 1 mM guaiakol eklenmiş kültürlerin en yüksek lakkaz aktivitesinin yine inkübasyonun 21. gününde 46781 U/L olduğu belirlenmiştir [35].

Yapılan bir çalışmada *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 soyu kullanılarak üç farklı koşulda üretim yapılmış ve üretim ortamlarına 30 mM konsantrasyonda bakır sülfat ilave edilmiştir. İçerisinde sıvı besiyerinin ve indükleyici madde olarak da bakırın bulunduğu ortamlarda fungus statik olarak 12 gün boyunca inkübe edilmiş ve en yüksek aktivite inkübasyonun 5. gününde 22.56 U/L olarak tespit edilmiştir. Beç ölçekli bir fermentörde gerçekleştirilen kesikli fermentasyon ile substrat olarak buğday kepeğinin kullanıldığı katı hal fermentasyonunda kültür ortamına bakır ilavesi sonucu lakkaz üretiminin arttığı, en yüksek aktivitelerin 12 günlük inkübasyonun 5. gününde sırasıyla 30.21 ve 48.89 U/L olduğu saptanmıştır. Elde edilen veriler en düşük lakkaz üretiminin geleneksel enzim üretim metodu olan statik üretim sonucunda, en yüksek lakkaz üretiminin ise katı hal fermentasyonu sonucunda gerçekleştiğini göstermektedir. Araştırmacılar en yüksek enzim üretiminin katı hal fermentasyonu ile elde edilmesinin nedenini bu fermentasyon ortamının düşük nem, indirgenmiş oksijen, kısmi basınç ve düşük azot içeriğine sahip olmasına bağlamaktadır. *Phanerochaete chrysosporium*' un doğada bulunduğu ortamın statik üretim koşulları ile benzer olmasının buna neden olduğu düşünülmektedir [92].

Ağaç kabuğundan izole edilen yeni bir beyaz çürükçül fungus soyu *WR-1* kullanılarak yapılan bir çalışmada fungusun kültür ortamına inkübasyonun 4. gününde

0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mM konsantrasyonlarda bakır sülfat ilave edilmiş ve fungus kesikli üretim yöntemi ile 150 rpm çalkalama hızında ve 28 °C ( $\pm 4$  °C) de toplam 10 gün boyunca inkübe edilmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi 1 mM bakır ilave edilmiş kültür ortamında inkübasyonun 7. gününde 410 U/mL olarak saptanmış olup, 2 mM ve daha yüksek bakır konsantrasyonlarının ilave edildiği ortamlarda ise fungus üremesi ve lakkaz aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Sonuç olarak 2 mM ve daha yüksek bakır konsantrasyonunun organizma üzerine toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir [32].

Bakır sülfatın *Trametes versicolor*, *Trametes pubescens*, *Trametes modesta* ve *Trametes hirsuta* gibi fungal türler için güçlü bir lakkaz indükleyicisi olarak görev yaptığı pek çok çalışmada rapor edilmiştir. *T. versicolor* ve *T. hirsuta* ile yapılan bir çalışmada kontrol amacıyla kullanılan kültür ortamına 0.0043 mM, diğer ortamlara ise 0.04 ve 1 mM konsantrasyonlarda CuSO<sub>4</sub> ilave edilmiştir. Buna ilaveten 1mM CuSO<sub>4</sub> ilave edilen kültür ortamlarının bazılarında 0.5, bazılarında da 2 mM konsantrasyonlarda 2,5-ksilidin de ilave edilmiş ve enzim aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Sadece bakır ilave edilmiş kültür ortamları için en yüksek aktivite, 1 mM bakır sülfat eklenmiş ortamlarda *T. hirsuta* için yaklaşık 101000 nkat/L iken, *T. versicolor*' da bu değer daha düşüktür. Her iki fungus türünden elde edilen en yüksek lakkaz aktivitesi ise 1 mM CuSO<sub>4</sub> ve 2 mM 2,5-ksilidin ilave edilmiş kültür ortamında saptanmıştır. Bu ortamda *T. hirsuta*' dan elde edilen en yüksek lakkaz aktivitesi 181000 nkat/L olup, bu değer *T. versicolor*' dan elde edilenin yaklaşık olarak 3–4 katıdır [149].

Ham madde olarak hindistan cevizinin kullanıldığı bir çalışmada *Trametes hirsuta*' nın kültür ortamına 2 mM konsantrasyonda bakır sülfat ilave edilmiş ve katı substrat fermentasyonu sürecinde 4 gün aralıklarla 36 gün boyunca lakkaz aktivitesi ölçülmüştür. Hem kontrol gruplarında hem de bakır ilave edilmiş kültür ortamında lakkaz üretimi inkübasyonun 10. gününde başlamış olup, kontrol gruplarının enzim aktiviteleri inkübasyonun 24. gününde, bakır ilave edilmiş ortamlarda ise lakkaz aktiviteleri inkübasyonun 22. gününde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bakır ilavesi ile fungusun en yüksek lakkaz aktivitesi 920.895 nkat/L oranında olup, bu değer kontrol gruplarından elde edilenin yaklaşık 3 katıdır [150].

*Pleurotus ostreatus* 32 soyunun üreme ortamına inkübasyondan 4 gün sonra 1 mM konsantrasyonda bakır ilave edilmiş ve fungus 28 °C' de statik koşullarda üretime alınmıştır. İnkübasyonun 18. gününde yapılan enzim aktivitesi ölçümü sonrasında bakır

ilave edilmiş kültür ortamındaki enzim aktivitesi kontrolün yaklaşık 4.5 katı olup, enzim aktivitesi 360 U/mL olarak saptanmıştır [151].

*Trametes pubescens* MB 89, *T. versicolor* MB 52, *T. versicolor* MB 54, *T. gibbosa* MB 187, *T. hirsuta* MB 50, *T. suaveolens* MB 51, *T. multicolor* MB 49, *Ganoderma applanatum* MB 168, *Polyporus ciliatus* MB 76 ve *Panus tigrinus* MB 46 soyları kullanılarak yapılan bir çalışmada funguslar 25 °C ve 110 rpm' de çalkalamalı olarak inkübe edilmiş ve inkübasyondan 4 gün sonra glukoz içeren kültür ortamlarına 1 mM CuSO<sub>4</sub> ilave edilmiştir. İnkübasyonun 13. gününde enzim aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek lakkaz aktivitesi *Trametes pubescens* MB 89 soyunun kültür ortamından alınan örneklerde saptanmıştır. Aynı çalışmada *Trametes pubescens* MB 89' un kültür ortamına inkübasyondan 4 gün sonra 1mM konsantrasyonda Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ilave edilmiş ve Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> nin organizma üzerine yüksek oranda toksik olduğu ve bu ortamlarda lakkaz aktivitesinin düşük olduğu saptanmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda Mn<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> nin fungus üzerine toksik etki göstermediği ancak Zn<sup>2+</sup> nin lakkaz aktivitesi üzerine olumsuz etki gösterdiği gözlemlenmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi ise 5 mM CuSO<sub>4</sub> ilave edilmiş kültür ortamlarında ve inkübasyonun 32. gününde 68.5 U/mL olarak tespit edilmiştir [152].

Galhaup vd. (2002) *Trametes pubescens* MB 89 soyunu kullanarak yaptıkları diğer bir çalışmada inkübasyondan 4 gün sonra kültür ortamına 2 mM Cu ilave edilmiştir. Fungus kesikli üretim sürecinde çalkalamalı koşullarda 25 °C' de 16 gün inkübe edilmiş ve en yüksek lakkaz aktivitesi yaklaşık 330 U/mL olarak ölçülmüştür [153].

Baldrian ve Gabriel (2002) tarafından yapılan bir çalışmada *Pleurotus ostreatus*' un üretildiği azotça sınırlı sıvı ortama gelişimin 12. gününde 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 ve 5 mM Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ilave edilmiş ve fungus kesikli süreçte karanlık ortamda, 28 °C' de, statik olarak inkübe edilmiştir. Enzim aktivitesi ölçümü sonucunda 0.1 ve 0.2 mM konsantrasyonda gözle görülür bir yükselme gözlenmezken, en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 14. gününde 2 mM Cd ilave edilmiş ortamda kontrolden 18.5 kat daha yüksek olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada inkübasyonun 12. gününde kültür ortamına 0.2, 0.5, 1 ve 5 mM konsantrasyonlarda CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ilave edilmiş ve fungus yine 28 °C' de, statik koşullarda inkübe edilmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında en yüksek aktivite artışı 1 mM CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O eklenmiş kültür ortamında gerçekleşmiştir. Bu ortamda lakkaz aktivitesi kontrolden 8 kat daha yüksek iken, 0.5 mM bakır ilave edilmiş

ortamda aktivite 4.7, 5 mM bakır bulunan ortamda ise 3.7 kat artmıştır. İnkübasyonun 12. gününde kültür ortamlarına ayrı ayrı 1 mM konsantrasyonda AgNO<sub>3</sub>, HgCl<sub>2</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> gibi ağır metaller de eklenmiş ve fungus 28 °C’ de statik koşullarda inkübe edilerek üretimin 15. gününde aktivite ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonucunda bu ağır metallerin ilave edildiği ortamlarda lakkaz aktivitelerinin sırayla 0.26, 0.05, 2.00, 4.96 U/mL olduğu ve bu aktivite değerlerinin kontrole kıyasla (8.37 U/mL) daha düşük olduğu saptanmıştır [138].

Palmieri vd. (2000) tarafından yapılan çalışmada *Pleurotus ostreatus*’ un kültür sıvısına inokülasyonla birlikte 150 µM konsantrasyonda CuSO<sub>4</sub> ilave edilmiş ve buna bağlı olarak inkübasyonun 6. gününden sonra enzim aktivitesinde bakır bulunmayan temel ortama kıyasla lakkaz aktivitesinde 50 katlık bir artış gözlenmiş ve enzim aktivitesi 30 U/mL olarak tespit edilmiştir [154].

Yapılan bir çalışmada buğday sapı üzerinde gelişmekte olan *Pleurotus ostreatus* kültürlerinden kolonizasyonun erken basamağı olan 8. günde, kolonizasyonun tamamlandığı basamak olan 22. günde ve bitkisel substrat yıkımının en hızlı basamağı olan 28. günde kültür sıvısı alınmış, bu ekstraktlara 0.01–50 mM bakır ilave edilmiş ve 18 saatlik inkübasyondan sonra ekstraktlardaki lakkaz aktivitesi ölçülmüştür. Sekiz günlük kültürden sadece 0.5–10 mM arasında bakır eklenmiş olan ekstraktlarda lakkaz aktivitesi yükselmiştir. En yüksek aktivite kontrolden %40 daha fazla olarak 10 mM bakır bulunan ekstraktta saptanmıştır. Yirmi iki ve yirmi sekiz günlük kültür ekstraktlarında ise en yüksek lakkaz aktivitesi 1 mM bakır içerenlerde gerçekleşmiş olup, aktivite kontrole göre sırasıyla 3.2 ve 6.9 kat artmıştır [138].

Yapılan araştırmalar beyaz çürükçül fungusların normal gelişimleri için eser miktarda Cd, Mn veya Zn gibi ağır metallere ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. Ancak bu metallerin ortamda gereğinden birkaç kat fazla olması durumunda fungal gelişimi baskıladığı, morfolojik ve fizyolojik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, beyaz çürükçül funguslarla veya bu funguslardan izole edilmiş enzimlerle lignoselülozun ve ksenobiyotiklerin ekstraselüler yıkımı esnasında ağırmetallerin hem ekstraselüler enzimlerin aktivitesine hem de fungal kolonizasyona etki ettiği saptanmıştır [64].

*Stereum hirsutum* ve *Phanerochaete chrysosporium* ile yapılan bir çalışmada, kültür ortamına 0.1–1 mmol/L oranlarda kadmiyum nitrat ilave edilmiştir. İnkübasyonun 10. gününde kültür sıvıları alınarak lakkaz aktiviteleri ölçülmüş ve enzim aktiviteleri mU/g olarak ifade edilmiştir. Aktivite değerleri kontrol ile kıyaslandığında tüm konsantrasyonlarda lakkaz aktivitesinin düştüğü, dolayısıyla kadmiyumun kullanılan konsantrasyonlarda hem *S. hirsutum* hem de *P. chrysosporium*' dan elde edilen örneklerin lakkaz aktiviteleri üzerine inhibitör etki gösterdiği ifade edilmiştir. Kadmiyum ilave edilmemiş *S. hirsutum* ve *P. chrysosporium* kültür ortamlarında saptanan lakkaz aktiviteleri sırasıyla 0.77 ve 0.45 mU/g iken, en yüksek inhibitör etkinin gözlemlendiği 1mM Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ilavesi ile enzim aktiviteleri sırasıyla 0.05 ve 0.19 mU/g olarak saptanmıştır. [155].

Hatvani ve Mécs (2003) tarafından yapılan bir çalışmada *Lentinula edodes* 610 soyunun nişasta, malt özütü ve agar içeren katı besiyeri ortamına 0.005–6 mM gibi farklı konsantrasyonlarda Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, HgCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, PbNO<sub>3</sub>, veya ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O gibi ağır metal tuzları ilave edilmiş ve fungus oda sıcaklığında 11 günlük inkübasyona tabii tutulmuştur. Bu ağır metal tuzlarının fungus üremesi üzerine etkisi misel çapının ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu ağır metallerin lakkaz aktivitesi üzerine etkisi ise fungusun ürettiği katı kültür ortamından alınan örneklerin enzim aktivitesinin ölçülmesi ile saptanmıştır. Buna göre 1.5 mM konsantrasyonun üzerinde ağır metal ilave edilen katı besiyeri ortamlarından Fe, Pb ve Mn hariç hiçbir ortamda misel gelişimi gerçekleşmemiştir. *Lentinula edodes* 610 soyunun üremesini en fazla engelleyen ağır metal Cd olup, bu ağır metali sırasıyla Hg, Ni, Co, Zn, Cu, Fe, Pb ve en düşük toksik etkiye sahip olan Mn izlemektedir. Yapılan ölçümler sonucunda kontrol gruplarında lakkaz aktivitesi 23 U/L iken, aynı oranlarda üreme inhibisyonuna neden olan 0.0031 mM Cd, 0.0085 mM Hg, 0.16 mM Ni, 0.30 mM Co, 0.26 mM Zn, 0.78 mM Cu, 1.2 mM Fe, 0.89 mM Pb ve 2.4 mM Mn ilave edilmiş ortamlardaki lakkaz aktivitelerinin ise sırasıyla 79, 45, 144, 152, 93, 155, 0, 60, 97 U/L olduğu ifade edilmektedir [156].

*Trametes versicolor* ATCC 20869 ile yapılan bir çalışmada azotça sınırlı (1.2 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ve azotça zengin (12 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) kültür ortamlarına 3 µM ve 200 µM Mn<sup>2+</sup> ilave edilmiş ve fungusun kesikli süreçte lakkaz üretimi incelenmiştir. İnkübasyonun 12. gününde yapılan ölçümler sonucunda fungusun azotça fakir olan



ortamına 3  $\mu\text{M}$   $\text{Mn}^{2+}$  ilavesi ile en yüksek 1400 U/L, 200  $\mu\text{M}$   $\text{Mn}^{2+}$  ilavesi ile 850 U/L oranında lakkaz ürettiği saptanmıştır. Azotça zengin ortama 3  $\mu\text{M}$   $\text{Mn}^{2+}$  ilavesi ile fungusun 1030 U/L, 200  $\mu\text{M}$   $\text{Mn}^{2+}$  ilavesi ile de 420 U/L oranında lakkaz ürettiği tespit edilmiştir [157].

*Pleurotus ostreatus* CCBAS477 soyunun kullanıldığı bir çalışmada substrat olarak kullanılan buğday sapı 15 mL distile su veya 15 mL 0.1–5 mM  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisi ile nemlendirilmiş ve fungus katı substrat ortamına inoküle edilmiştir. Daha sonra fungus 28 °C’ de katı substrat fermentasyonu sürecinde karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda 0.1–0.5 mM Cd ilave edilmiş kültür ortamlarında belirgin bir enzim aktivitesi gözlenmezken, 1–5 mM Cd ilave edilmiş ortamlarda lakkaz aktivitesinde kontrole kıyasla artış gözlenmiştir. İnkübasyonun 7. gününde kontrol gruplarında enzim aktivitesi 340 U/L iken, 2 mM Cd ilave edilmiş ortamda aktivite 120 U/L, 5 mM ilave edilmiş ortamda ise 28 U/L olarak saptanmıştır. Yedi günlük inkübasyon sonucunda en yüksek aktivitenin elde edildiği ortam 1mM Cd eklenmiş kültür ortamı olup, inkübasyonun 16. gününde bu ortamdaki lakkaz aktivitesi 690 U/L iken, 2–5 mM Cd bulunduran ortamlarda lakkaz aktivitesi yaklaşık 1370 U/L olarak belirlenmiştir [158].

### **2.1.2. Çeşitli ortamların ve indükleyicilerin lakkaz üretimi ve aktivitesi üzerine etkisi**

*Trametes pubescens* MB 89 ile yapılan bir çalışmada fungus 25 °C’ de 110 rpm’ de çalkalamalı olarak inkübe edilmiş ve inkübasyondan 4 gün sonra glukoz içeren kültür ortamlarına ayrı ayrı 1 mM konsantrasyonda p-anisidin, kateşol, gallik asit, guaiakol, tannik asit ve 2,5-ksilidin ilave edilmiştir. İnkübasyonun 13. gününde enzim aktivitesi ölçülmüş ve test edilen aromatik bileşikler içerisinde lakkaz üretimini en fazla arttıran bileşiğin 2,5-ksilidin olduğu saptanmıştır. Kültür ortamına 2,5-ksilidin ilavesi ile 8 U/mL oranında lakkaz üretimi gerçekleşmiş olup, bu oran kontrol gruplarında üretilenin 4 katı olarak ifade edilmektedir [152].

*Trametes pubescens* MB 89 soyunun kullanıldığı diğer bir çalışmada ise inkübasyondan 4 gün sonra kültür ortamına ayrı ayrı farklı karbon kaynakları ilave edilmiş ve bu karbon kaynaklarının lakkaz üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Buna

göre; 5 g/L bira mayası özütü, 5 g/L kazein kökenli pepton, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve 1 g/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O içeren besiyerine son konsantrasyonda 20 g/L olacak şekilde glukoz, fruktoz, sellobiyoz, gliserol, laktoz, α-selüloz eklenmiştir. Kesikli üretim sürecinde, çalkalamalı koşullarda, 25 °C’ de ve 16 gün boyunca inkübe edilen fungusun kullanılan karbon kaynaklarından son derece etkilendiği ve özellikle glukoz veya sellobiyoz bulunan ortamlarda yüksek oranlarda (60–65 U/mL) lakkaz ürettiği gözlemlenmiştir. Buna göre 5 g/L bira mayası özütü, 5 g/L kazein kökenli pepton, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve 1 g/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O içeren besiyeri ortamına 10, 20, 40 ve 60 g/L oranında glukoz eklenmiş ve yapılan enzim ölçümleri sonucunda en yüksek lakkaz aktivitesinin 40 g/L glukoz bulunan ortamda yaklaşık 175 U/mL olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, 60 g/L glukoz bulunan ortamda ise lakkaz üretiminin baskılandığını rapor etmektedir. Farklı azot kaynaklarının lakkaz üretimi üzerine etkisini saptamak amacıyla 40 g/L glukoz ve 1 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve 1 g/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O bulunan besiyerine 10 g/L konsantrasyonda ayrı ayrı asparajin, tripton, bira mayası özütü, et kökenli pepton, kazein kökenli pepton ve kazein kökenli pepton ile birlikte bira mayası özütü eklenmiş ve en yüksek enzim aktivitesinin et kökenli pepton ilave edilmiş besiyeri ortamında 319 U/mL olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar lakkaz üretimini daha da artırabilmek amacıyla 40 g/L glukoz, 10 g/L et kökenli pepton ve 1 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve aynı oranda CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O içeren kültür ortamlarına son konsantrasyonda ayrı ayrı 1 mM 2,5-ksilidin, vanillik asit, guaiakol, gallik asit, ferulik asit, kateşol ve p-anisidin gibi farklı aromatik bileşikler ekleyerek lakkaz aktivitesi ölçmüştür. En yüksek enzim aktivitesi ise gallik asit ilave edilmiş ortamda yaklaşık 350 U/mL olduğu ifade edilmektedir [153].

Arora ve Gill (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, inkübasyon periyodunun, fungusların üretildiği farklı temel ortamların ve bu temel ortamlara ilave edilen farklı katkı maddelerinin *Phlebia fascicularia*, *P. floridensis* ve *Dichomitus squalens* türleri tarafından üretilen lakkaz enzimleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan funguslar kesikli üretim sürecinde 25±1 °C’ de statik olarak inkübe edilmiş ve iki günlük aralıklarla enzim aktivitesi tayin edilmiştir. En yüksek lakkaz üretimi *P. floridensis*’ de inkübasyonun 8. gününde, *P. fascicularia*’ da 10. gününde ve *D. squalens*’ de ise 18. gününde gerçekleşmiştir. Biyokütle ise *D. squalens*’ de inkübasyonun 16. gününde, *Phlebia* spp. için ise 8. gününde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. *Phlebia* spp.’ de biyokütlenin azalışıyla birlikte 20. günde hem enzim

üretiminde hem de spesifik lakkaz aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Bunun nedeninin fungal otoliz esnasında açığa çıkan az miktarda intraselüler lakkaz olabileceği ifade edilmektedir. Farklı besiyeri ortamlarının enzim üretimi üzerine etkisini gözlemleyebilmek amacıyla funguslar MSB, MEB ve MSB-MEB ortamlarında inkübe edilmiş ve lakkaz aktivitesi ölçülmüştür. *P. fascicularia* için en yüksek lakkaz aktivitesinin MSB-MEB ortamında 4.930 cU/mL, *D. squalens* ve *P. floridensis* için ise pek çok aminoasiti bir arada bulunduran MEB ortamında sırasıyla 4.955 ve 2.650 cU/mL olduğu rapor edilmektedir [42].

*Trametes versicolor* CBS100.29 soyunun kullanıldığı bir çalışmada lakkaz üretimini artırmak amacıyla fungusun kültür ortamına üzüm tohumu, üzüm sapı ve arpa kepeği gibi kolayca elde edilebilen ve düşük maliyetli lignoselülozik maddeler eklenerek, fungus batık yöntem ile inkübe edilmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi arpa kepeği ilave edilmiş ortamlarda inkübasyonun 37. gününde yaklaşık 600 U/L olup, bu değer kontrol kültürlerinden yaklaşık 10 kat daha yüksektir. Üzüm sapının ve üzüm tohumunun ilave edildiği ortamlarda ise en yüksek enzim aktiviteleri de inkübasyonun 37. gününde sırasıyla 400 U/L ve 250 U/L olarak saptanmıştır [159].

Lakkaz üreticisi olarak *Daedalea flavida*, *Phlebia brevispora*, *Phlebia radiata* ve *Polyporus sanguineus*' un kullanıldığı bir çalışmada, temel besiyerleri olarak MSB, MEB ve MSB-MEB kullanılmıştır. Lakkaz üretimini artırmak amacıyla bu üç temel besiyerine ayrı ayrı veratril alkol ve guaiakol ilave edilirken, MSB ve MEB ortamına ayrı ayrı buğday sapı, pirinç sapı ve şeker kamışı, sadece MSB ortamına ise indülin AT, polifon, reaks ve lignosülfonat ilave edilmiş ve funguslar kesikli üretim metodu ile  $25 \pm 1$  °C' de statik olarak inkübe edilmiştir. *D. flavida* ve *P. brevispora* için en yüksek lakkaz aktivitesi buğday sapının ilave edildiği MSB ortamında sırasıyla 9.25 cU/mL ve 8.900 cU/mL iken, *P. radiata* için en yüksek aktivite guaiakol eklenmiş MSB- MEB temel ortamında 11.590 cU/mL, *P. sanguineus* için ise en yüksek enzim aktivitesi şeker kamışı ilave edilmiş MEB ortamında 8.99 cU/mL olarak saptanmıştır [160].

Dhawan ve Kuhad (2002) tarafından yapılan bir çalışmada *Cyathus bulleri*' nin üretildiği %2' lik (w/v) katı malt özütü ortamına lakkaz üretimini artırmak için %0.2 (w/v) oranında çeşitli amino asitler ve vitaminler ilave edilmiş ve fungus 30 °C' de statik koşullarda inkübe edilmiştir. Kontrol kültürlerinde 7.0 U/mL oranında lakkaz aktivitesi saptanmışken, bu amino asitlerden DL-metiyonin, DL-triptofan, glisin ve DL-valin ilave edilmiş ortamlardaki enzim aktivitesi sırasıyla 27.8, 21.8, 21.8 ve

14.3 U/mL olarak ölçülmüştür. Kullanılan amino asitlerden L-sistein monohidroklorit ilave edilmiş ortamda ise lakkaz üretiminin tamamen inhibe olduğu saptanmıştır. Biotin, piridoksin hidroklorit ve riboflavin ilave edilmiş ortamlarda kontrole kıyasla daha yüksek enzim aktivitesi elde edilmiş olup, enzim aktiviteleri sırasıyla 36.0, 18.4, 17.2 U/mL olarak belirlenmiştir [161].

Jang vd. (2002) tarafından *Trametes* sp. kullanılarak yapılan bir çalışmada tutuklanmamış fungusun kültür ortamına lakkaz üretimini artırmak amacıyla 1 mM 2,5-ksilidin ve 1 mM 2,5-ksilidin ile 1 mM ABTS ilave edilmiş ve fungus çalkalamalı koşullarda kesikli yöntemle inkübe edilmiştir. Yapılan enzim aktivitesi ölçümü sonucunda lakkaz aktivitesi kontrol ortamında 4400 U/L, 1 mM 2,5-ksilidin ilave edilmiş ortamda 12500 U/L, 1 mM 2,5-ksilidin+1 mM ABTS ilave edilmiş ortamda ise 15800 U/L olarak saptanmıştır. Kesikli süreçte inkübe edilen tutuklanmamış fungus miselleri ile tutuklanmış fungus miselleri tarafından üretilen lakkaz üretimi kıyaslandığında en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 7. gününde sırasıyla 14600 ve 7800 U/L olarak tespit edilmiştir. Belirli periyotlarla kültür sıvısının uzaklaştırıldığı aynı oranda taze besiyerinin ilave edildiği tekrarlı kesikli üretim sürecinde serbest fungus miselleri kullanılarak kesikli yöntemle göre daha yüksek oranda ve daha uzun süre lakkaz üretimi gerçekleştirilmiş ve 20000 U/L oranında lakkaz aktivitesi saptanmıştır [162].

*Trametes versicolor* kullanılan bir çalışmada Rancaño vd. (2003) lakkaz üretimini artırmak için havalandırılmalı biyoreaktör içerisinde üretilen fungusun kültür ortamına ayrı ayrı 1 mM ksilidin, 2 mM veratril alkol ve 40 g/L etanol gibi indükleyicileri ilave etmişlerdir. Hem kontrol hem indükleyici madde ilave edilmiş funguslar biyoreaktör içerisinde 16 gün boyunca inkübe edilmiş ve her 2 günde bir enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bu ortamlar içerisinde en yüksek lakkaz aktivitesi 1 mM 2,5-ksilidin ilave edilmiş ortamda 1500 U/L olarak saptanmış olup, bu değer kontrol gruplarından elde edilen enzim aktivitesinin yaklaşık 14 katı olduğu rapor edilmiştir [163].

Yarı katı substrat fermentasyonu sürecinde üretilen *Trametes versicolor*' un kullanıldığı bir çalışmada en uygun destek maddesini saptamak amacıyla ortama ayrı ayrı poliüretan köpük, buğday sapı, arpa sapı, odun talaşı ve arpa kepeği eklenmiş ve ayrıca kültür ortamlarına lakkaz üretimini artıracak çeşitli indükleyiciler ilave edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda en iyi destek maddesinin arpa kepeği olduğu

saptanmış ve bu ortamda en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 18. gününde 1155 U/L olarak belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda destek maddesi olarak arpa kepeği seçilmiş ve bu ortama kültürasyonun başlangıcında lakkaz üretimini artırmak amacıyla 1 mM ksilidin ve 2 mM veratril alkol ayrı ayrı ilave edilmiştir. Yapılan enzim aktivitesi ölçümü sonucunda ksilidin ilave edilmiş kültürlerde en yüksek aktivite inkübasyonun 16. gününde yaklaşık 1700 U/L iken, veratril alkol ilave edilmiş kültürlerde ise en yüksek enzim aktivitesi inkübasyonun 16. gününde yaklaşık 1480 U/L olarak saptanmıştır. Kültür ortamına taze destekleyici madde ilavesinin lakkaz üretimi üzerine etkisini belirleyebilmek amacıyla araştırmacılar yeni bir deney düzeneği hazırlamış ve inkübasyonun 12. gününde kültür ortamına taze arpa kepeği ilave etmişlerdir. Yapılan enzim ölçümü sonucunda hem en yüksek aktivitenin gözlemlendiği ortam olan ksilidin ilave edilmiş ortamda hem de daha düşük aktivitenin saptandığı veratril alkol eklenmiş ortamda lakkaz aktivitelerinin 2000 U/L' nin üzerine çıktığı tespit edilmiştir [164].

*Trametes modesta* ile yapılan bir çalışmada fungusun üreme ortamına ferulik asit, veratril alkol, 2,5-ksilidin, gallik asit, şiringik asit, kaffeik asit gibi indükleyici maddeler eklenmiş ve fungus 30 °C' de 130 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 5 gün sonra lakkaz aktivitesi ölçülerek bu maddelerin lakkaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Test edilen tüm indükleyici maddeler kontrole kıyasla lakkaz üretimini artırmıştır. En yüksek lakkaz aktivitesi 2,5-ksilidin ilave edilmiş ortamda kontrol kültürlerinden elde edilenin 4 katı olarak saptanmıştır. Lakkaz üretimini 2,5-ksilidinden sonra en fazla artıran indükleyicinin veratril alkol olduğu tespit edilmiştir [165].

*Lentinula edodes* UFV52 izolatının lakkaz üretimini artırmak için sıvı kültür ortamına çeşitli indükleyicilerin ilave edildiği bir çalışmada ortama 1 mM gallik asit, 1 mM kateşol, 55 µM amonyum tartarat, 1 mM 3-hidroksibenzoik asit ve 1 mM vanillin ayrı ayrı ilave edilerek, fungus karanlık ortamda 25 °C' de statik olarak inkübe edilmiştir. Lakkaz aktivitesi fungusun bu ortamlara inokülasyonundan 8 gün sonra saptanmıştır. En yüksek aktivite inkübasyonun 30. gününde, amonyum tartarat ilave edilmiş kültür ortamında 251 U/mL olarak tespit edilmiştir. Test edilen indükleyiciler içerisinde en düşük lakkaz aktivitesi 3-hidroksibenzoik asit ilave edilmiş ortamlarda saptanmıştır. Bu ortamlardaki en yüksek aktivite ise inkübasyonun 21. gününde 3.5 U/mL olarak belirlenmiştir [143].

*Trametes versicolor*' un kullanıldığı bir çalışmada, derin kültür yöntemi ile 26 °C' de 175 rpm çalkalama hızında üretilen fungusun kültür ortamına inkübasyonun 3. gününden sonra veratril alkol, ferulik asit, kateşol, indulin AT ve fenol gibi aromatik indükleyiciler eklenerek, bu indükleyicilerin lakkaz üretimi üzerine etkisi saptanmıştır. En yüksek lakkaz aktivitesi, inkübasyonun 4. gününde son konsantrasyonda 10 mg/L fenol içeren ortamlarda 2575 U/L olarak saptanmış olup, bu değer fenol içermeyen kontrol ortamındaki lakkaz aktivitesinin 1227.5 katı olarak ifade edilmektedir. Araştırmacılar, farklı fenol konsantrasyonlarının lakkaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla kültür ortamlarına 5, 10, 25, 50, 100 mg/L oranlarda fenol ilave etmiş ve en yüksek lakkaz aktivitesini 10 mg/L fenol ilave edilmiş ortamda saptamışlardır [166].

*Trametes versicolor* ve *Abortiporus biennis* beyaz çürükçül funguslarının sıvı mineral ortamlarına parakuat ilave edilmiş ve bu pestisit lakkaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. On gün boyunca 25 °C' de statik olarak inkübe edilen *T. versicolor* ve *A. biennis* kültürlerine sırasıyla 25 µM ve 20 µM parakuat ilavesinden 5 gün sonra en yüksek lakkaz aktivitesi sırasıyla 100 nkat/mg ve 26 nkat/mg olarak saptanmıştır. Araştırmacılar kültür ortamına pestisit ilavesi ile yüksek oranda lakkaz üretilbileceğini belirtmiştir [167].

Shah vd. (2006) tarafından *Pleurotus ostreatus* kullanılarak yapılan bir çalışmada 100 mL' lik erlenler içerisinde 20 mL hacimde azotça sınırlı besiyeri ortamları hazırlanmış ve bu ortamlara 200 µL DMSO çözeltisi eklenerek fungus 27 °C' de, 21 gün boyunca statik olarak inkübe edilmiştir. Beşer günlük periyotlarla kültür ortamlarından birer mL örnek alınmış ve lakkaz aktivitesi ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda kontrol gruplarında en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 14. gününde 0.053 U/mL iken, DMSO ilave edilmiş ortamlarda ise en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 21. gününde 0.068 U/mL olarak belirlenmiştir [168].

*Rhizoctonia praticola*' nın kullanıldığı bir çalışmada kültür ortamına 0.02, 1 ve 5 mM konsantrasyonlarda ferulik asit, veratrik asit, ksilidin, *o*-anisidin, *p*-anisidin ilave edilmiş ve funguslar kesikli süreçte 9 gün boyunca çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. Herhangi bir şekilde aromatik bileşik ilave edilmemiş kontrol kültürlerinde en yüksek aktivite inkübasyonun 3. gününde 960.1 nkat/L' dir. Test edilen indükleyiciler içerisinde lakkaz aktivitesini en fazla artıran madde 0.02 mM konsantrasyondaki 2,5-ksilidin olup, en yüksek aktivite inkübasyonun 4. gününde 1592.6 nkat/L olarak saptanmıştır. Besiyerinin başlangıç pH' sı, lakkaz aktivitesinin artırılmasında en önemli

parametrelerden biri olup, çalkamalı koşullarda inkübe edilen fungusun besiyerinin pH' sı 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5' e ayarlanmış olup, bu ortamlarda en yüksek lakkaz aktivitesi pH' sı 7.5' e ayarlanmış kültür ortamında inkübasyonun 3. gününde yaklaşık 4100 nkat/L olarak saptanmıştır. [141].

*Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* 493 soyu, *Pleurotus ostreatus* 494 soyu ve *Pleurotus pulmonarius* türleri kullanılarak yapılan bir çalışmada besiyerinde glukoz, maltoz, mannitol, D-glukonik asidin sodyum tuzu, ksilan, selüloz, karboksimetilselüloz, mandalina kabuğu, asma talaşı gibi karbon kaynaklarından biri kullanılarak funguslar derin fermentasyon ve katı substrat fermentasyonu sürecinde inkübe edilmiştir. Buna göre, en yüksek lakkaz aktiviteleri *P. eryngii* için mandalina kabuğu içeren besiyerinde  $22\pm 2$  °C' de 180 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen derin fermentasyon sonucunda 999.5 U/L, *P. ostreatus* 493 soyu, *P. ostreatus* 494 soyu ve *P. pulmonarius* için ise asma talaşı içeren besiyerinde katı substrat fermentasyonu sonucunda sırasıyla 2144.6, 378, 391 U/L olarak saptanmıştır. Besiyerinde pepton, vitamin içermeyen kazein asit hidrolizatı, mısır özütü, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> gibi azot kaynaklarından biri kullanılarak, aynı funguslar yine  $22\pm 2$  °C' de 180 rpm çalkalama hızında derin fermentasyon ve katı substrat fermentasyonu sürecinde üretilmiştir. Buna göre, en yüksek lakkaz aktiviteleri *P. eryngii* ve *P. ostreatus* 493 soyu için (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren besiyerinde sırasıyla 246.4 ve 445 U/L, *P. ostreatus* 494 soyu ve *P. pulmonarius* için ise NH<sub>4</sub>Cl içeren besiyerinde sırasıyla 466.2 ve 441.0 U/L olarak belirlenmiştir [169].

Yarı katı ve sıvı ortamlarda *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Lentinula edodes* ve *Botrytis cinerea*' nın kullanıldığı bir çalışmada *T. versicolor* ve *T. villosa*' nın üretildiği malt ekstrakt agar ortamına 0.8 mM ferulik asit ilave edilmiş ve funguslar 28 °C' de statik olarak inkübe edilmiştir. *T. versicolor*' un en yüksek lakkaz aktivitesinin inkübasyonun 21. gününde 588 U, *T. villosa*' nın ise inkübasyonun 7. gününde 95 U olduğu saptanmıştır. *L. edodes*' in üretildiği malt ekstrakt agar ortamına 0.8 mM ferulik asit ilavesi ile en yüksek aktivite inkübasyonun 7. gününde 2.4 U olarak belirlenmiştir. *B. cinerea*' nın üreme ortamına ise aynı konsantrasyonda gallik asit ilavesi ile en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 14. gününde 8.1 U olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, *T. versicolor* ve *T. villosa*'nın üretildiği malt ekstrakt agar ortamına 0.3, 0.8 ve 8 mM konsantrasyonlarda 2,5-ksilidin ilave edilmiş ve farklı konsantrasyonlarda 2,5-ksilidinin enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır.

*T. versicolor* için en yüksek lakkaz aktivitesi 0.8 mM 2,5-ksilidinin ilave edildiği kültür ortamında inkübasyonun 21. gününde 558 U olarak saptanırken, *T. villosa*'nın en yüksek lakkaz aktivitesi ise 8 mM 2,5-ksilidin eklenmiş ortamda inkübasyonun 14. gününde 304 U olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca *T. versicolor*, *T. villosa* ve *B. cinerea*'nin üretildiği sıvı kültür ortamına 0.5 mM konsantrasyonda 2,5-ksilidin, gallik asit ve ferulik asit ayrı ayrı ilave edilmiş olup, funguslar 28 °C' de 240 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiş ve kültivasyonun 4, 8, 12, 16 ve 20. günlerinde lakkaz aktivitesi ölçülmüştür. *T. versicolor*, *T. villosa* için en yüksek lakkaz aktivitesi 2,5-ksilidin ilave edilmiş ortamda inkübasyonun 16. gününde sırasıyla 5318 U ve 155 U iken, *B. cinerea* için ise en yüksek aktivite gallik asit ilave edilmiş ortamda yine inkübasyonun 16. gününde 81 U olarak belirlenmiştir [147].

Hou vd. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada *Pleurotus ostreatus* 32 soyu azotça sınırlı (0.5 g/L üre) ve azotça zengin (5 g/L üre) ortamda statik ve çalkalamalı koşullarda inkübe edilmiş ve bu koşulların fungusun lakkaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Azotça zengin ortamda çalkalamalı koşullar altında inkübe edilen fungusun kültür sıvısında lakkaz aktivitesi saptanamazken, aynı ortamda statik koşullar altında yaklaşık 40 U/mL enzim aktivitesi belirlenmiştir. Azot sınırlı ortamda statik kültürlerdeki lakkaz aktivitesinin ise aynı ortamda çalkalamalı olarak inkübe edilen kültürlerden 2 kat daha yüksek olduğu ifade edilmektedir. Azot sınırlı ortamda statik koşullarda inkübe edilen funguslardaki en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 14. gününde 85 U/mL' dir. Aynı araştırmacılar besiyerinde kullanılan karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla besiyerine ayrı ayrı sellobiyoz, glukoz, gliserol, selüloz ve nişasta ilave ederek fungusu statik koşullarda inkübe etmişlerdir. En yüksek enzim aktivitesi sellobiyoz ilave edilmiş ortamda inkübasyonun 12. gününde 120 U/mL olarak tespit edilmiştir. İnkübasyonun 12. gününde yapılan ölçümler sonucunda en düşük aktivite ise nişasta eklenmiş ortamda yaklaşık 30 U/mL olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada, farklı azot kaynaklarının lakkaz üretimi üzerine etkisini gözlemlemek için besiyeri ortamına üre, amonyum sülfat, amonyum tartarat bira mayası özütü ve pepton eklenmiş, en yüksek aktivitenin pepton ilave edilmiş ortamda 129 U/mL olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın son aşamasında inkübasyonun 4. gününden sonra lakkaz üretimini artırmak amacıyla üreme ortamına ayrı ayrı 1 mM konsantrasyonda ABTS, veratril alkol, guaiakol, ferulik asit, tirozin ve 0.05 mM 2,5-ksilidin eklenmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi ABTS ilave edilmiş ortamda



yaklaşık 410 U/mL olup, bu değer kontrolün yaklaşık 5 katı olarak ifade edilmektedir. [151].

Revankar ve Lele (2006) tarafından yapılan çalışmada bir beyaz çürükçül fungus soyu olan *WR-1*' in optimize edilmiş kültür ortamına inkübasyonun 4. gününde 1 mM konsantrasyonda ayrı ayrı *p*-anisidin (*p*-metoksi anilin), gallik asit (3,4,5-trihidroksi benzoik asit), ferulik asit (4-hidroksi-3-metoksi benzoik asit), kateşol, guaiakol, 1-hidroksibenzotriazol (HBT) ve 2,5-ksilidin gibi aromatik indükleyiciler ilave edilmiştir. Üreme ortamına indükleyici madde ilavesinden sonra fungus 28 °C' de 150 rpm çalkalama hızında inkübe edilerek bu indükleyicilerin lakkaz aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda kontrol gruplarında en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 7. gününde 280 U/mL iken, indükleyici ilave edilmiş ortamlarda en yüksek enzim aktivitesi inkübasyonun 6. gününde saptanmıştır. Lakkaz aktivitesini artıran en etkili indükleyiciler sırasıyla 2,5-ksilidin (614 U/mL), *p*-anisidin (472 U/mL), gallik asit (447 U/mL) ve ferulik asit (433 U/mL) olarak belirlenmiştir. En etkili indükleyici olarak saptanan 2,5-ksilidin konsantrasyonu 1 mM' dan 0.8 mM' a düşürüldüğünde enzim aktivitesinin 614 U/mL' den 692 U/mL' ye çıktığı ifade edilmektedir [32].

Gnanamani vd. (2006) konstitütif olarak lakkaz sentezleyen *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 soyunun kültür ortamına lakkaz üretimini artırmak amacıyla ayrı ayrı 400 mM veratril alkol, 50 mg/l sikloheksimid, 300 mM gallik asit ve 300 mM guaiakol ilave etmiş ve ortam pH' sını pH 5.5' e ayarlamışlardır. Fungus besiyeri ortamına inoküle edildikten sonra 35 °C' de statik olarak 12 gün boyunca inkübe edilmiş ve günlük olarak lakkaz aktivitesi ölçülmüştür. En yüksek lakkaz aktiviteleri inkübasyonun 5. gününde veratril alkol ve sikloheksimit ilave edilmiş ortamlarda sırasıyla 18.6±2.0 ve 17.32±1.4 U/L olarak rapor edilmektedir [92].

Shah vd. (2006) tarafından *Pleurotus ostreatus* kullanılarak yapılan bir çalışmada lakkaz üretimini artırmak amacıyla indükleyici madde olarak kültür ortamına %1 (v/v) DMSO ilave edilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi kontrol gruplarında inkübasyonun 24. gününde 0.053 U/mL iken, DMSO ilave edilen kültürlerde enzim aktivitesinin 0.068 U/mL olduğu saptanmıştır [168].

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Çalışmalarda Kullanılan Funguslar**

Bu çalışmada, Basidiomycetes sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslardan *Funalia trogii* ATCC 200800 ve *Trametes versicolor* ATCC 200801 kullanıldı. Bu funguslar İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji-Biyoteknoloji laboratuvarında saf kültür olarak muhafaza edilmektedir.

#### **3.2. Çalışmalarda Kullanılan Fungusların Katı Besiyerinde Üretimi ve Saklanması**

Çalışmalarda kullanılan fungusların devamlılığını sağlamak için funguslar, SDA (Sabouraud Dekstroz Agar) plaklarında 30 °C' ye ayarlanmış statik inkübatörde (Sanyo MIR 252) 6 gün inkübe edildi ve her 4–5 haftada bir taze besiyerine pasajlamaları yapıldı. İnkübasyon sonucu elde edilen fungus kültürleri +4 °C' de buzdolabında saklandı.

#### **3.3. Çalışmalarda Kullanılan Fungusların Sıvı Besiyerinde Üretimi ve Peletlerin Hazırlanması**

Yatık agarda üretilen fungus kültürlerine 10 mL steril distile su eklenerek misel süspansiyonu hazırlandı. Elde edilen bu misel süspansiyonundan 5 mL alınarak 100 mL SDB (Sabouraud Dekstroz Broth) içeren 250 mL' lik erlene aktarıldı ve 30 °C' de 150 rpm' de çalkalamalı inkübatörde 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür düşük devirde homojenize edilerek çalışmalarda kullanılacak stok kültür hazırlanması amacıyla 7 mL kültür 600 mL SDB besiyeri ortamlarına steril koşullarda ekildi. Ekim işlemi sonrasında funguslar pelet oluşumu için 30 °C ve 150 rpm' de çalkalamalı inkübatörde 5 gün inkübe edilmiş ve üretim sonrası oluşan peletler aseptik koşullarda süzülerek amaca uygun olarak çalışmalarda kullanıldı.

### 3.4. Çalışmalarda Enzim Üretim Ortamı Olarak Kullanılan Besiyerlerinin İçeriği ve Hazırlanması

#### 3.4.1. Çalışmalarda enzim üretim ortamı olarak kullanılan STO ile STO+0.5 mM CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O' nun içeriği ve hazırlanması

Çalışmalarda enzim üretim ortamı olarak kullanılan STO (Stok Temel Ortam) ve STO+0.5mM Cu' nun içeriği Çizelge 3.1' de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** STO ve STO+0.5mM Cu' nun içeriği

Kullanılan Bileşen	STO	STO+0.5mM Cu
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	0.2	0.2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (g)	0.1	0.1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g)	0.05	0.05
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	0.5	0.5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g)	0.035	0.035
Glukoz (g)	2	2
Maya Özütü (g)	1	1
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (g)	0	0.12484
Distile su (mL)	1000	1000

Çizelge 3.1' de belirtilen besiyeri bileşenlerinin oranları 1500 mL son hacime uyarlanarak hassas terazide tartıldı ve 2000 mL' lik erlenler içerisine aktarıldı. Son hacim 1500 mL olacak şekilde distile su ilave edilerek hazırlanan besiyerleri 121 °C, 1.5 atm basınç altında 20 dakika süresince otoklavda steril edildi ve soğumaya bırakıldı. Soğutma işleminden sonra besiyerlerinin pH' sı aseptik şartlarda pH metrede ölçüldü ve daha sonra 5N HCl ve 5N NaOH kullanarak pH ayarlaması yapılarak çalışmalarda kullanıldı.

### 3.5. Lakkaz Üretim Yöntemleri

#### 3.5.1. Kesikli yöntem

Bu yöntem hazır pelet kullanılması ile klasik kesikli metottan, besiyerinin periyodik olarak değiştirilmemesinden dolayı da tekrarlı kesikli yöntemden ayrılır. Kesikli yöntem tekrarlı kesikli süreçte gerçekleştirilen çalkalama optimizasyonunda statik, inkübasyon zamanı optimizasyonunda ise çalkalamalı olarak test edilmiştir. Buradaki amaç, tekrarlı kesikli yöntem ile kesikli yöntemi lakkaz üretim verimi açısından kıyaslamaktır. Statik koşullarda Bölüm 3.3' de ifade edildiği gibi hazırlanan *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletleri aseptik koşullarda üçer tekrarlı olacak şekilde 250 mL' lik erlenlere sırası ile 0.68 ve 0.70 g olacak şekilde tartıldı ve üzerlerine 50 mL STO ve STO+0.5mM Cu ilave edilerek 30 °C' de statik koşullarda inkübasyona bırakıldı. Beş gün boyunca her 24 saatte bir besiyerlerinden mikropipet ile 500 µl örnek alındı ve lakkaz aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edildi. Çalkalamalı çalışmalar ise 150 rpm' de yürütüldü. Beş gün devam eden çalışma esnasında 12. saate kadar 2 saatte bir, 24. saate kadar 12 saatte bir ve daha sonra 120. saate kadar 24 saatte bir steril koşullarda besiyerlerinden 500 µl örnek alınıp, alınan örnekteki lakkaz aktivitesi spektrofotometrik olarak saptandı.

#### 3.5.2. Tekrarlı kesikli yöntem

Lakkaz üretimi açısından kesikli üretim yöntemine göre çok daha verimli bir yöntem olan tekrarlı kesikli yöntem yapılan çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Bölüm 3.3' de belirtildiği gibi hazırlanan *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletleri steril koşullarda üçer tekrarlı olacak şekilde 250 mL' lik erlenlere kuru ağırlık olarak sırasıyla 0.68 ve 0.70 g olacak şekilde tartıldı ve üzerlerine 50 mL STO ve STO+0.5 mM Cu ilave edildi. Peletler 30 °C' de, 150 rpm çalkalama hızında 24 saat inkübe edildikten sonra steril koşullarda süzülerek alındı ve üzerlerine aynı miktarda STO ve STO+0.5 mM Cu eklendi. Beş gün boyunca her 24 saatte bir elde edilen süzüntülerdeki lakkaz aktivitesi spektrofotometrik olarak saptandı.

### **3.6. Optimizasyon Çalışmaları**

#### **3.6.1. Bakırın lakkaz üretimi üzerine etkisinin saptanması**

Bölüm 3.3' de belirtildiği gibi hazırlanan *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletleri sırası ile 0.68 g ve 0.70 g olacak şekilde 250 mL' lik erlenlere aktarıldı ve 0.25, 0.5, 1, 2, 5 mM CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O içeren STO besiyerleri üzerine eklendi. Daha sonraki süreçte funguslar 30 °C ve 150 rpm' de 24 saat inkübe edildi. Kontrol amacıyla bakır içermeyen STO besiyerleri de benzer şekilde peletler üzerine eklenerek kullanıldı.

#### **3.6.2. Çalkalama hızının lakkaz üretimi üzerine etkisinin saptanması**

Lakkaz üretimi açısından en uygun çalkalama hızının saptanması amacıyla tekrarlı kesikli süreçte; statik ve 50, 100, 150, 200, 250 rpm çalkalama hızlarında çalışmalar yürütüldü. Statik koşullarda tekrarlı kesikli süreç ve kesikli sürecin lakkaz üretim verimi de ayrıca karşılaştırıldı.

#### **3.6.3. Besiyeri pH' sının lakkaz üretimi üzerine etkisinin saptanması**

STO ve STO+0.5mM Cu besiyerlerinin pH' larının *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine etkisini belirlemek amacıyla aseptik koşullarda 5N HCl ve 5N NaOH kullanarak pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0' a ayarlandı ve lakkaz üretimi için en uygun ortam pH' sı saptandı.

#### **3.6.4. İnkübasyon sıcaklığının lakkaz üretimi üzerine etkisinin saptanması**

En yüksek enzim üretilen sıcaklık aralığının saptanması amacıyla çalışmalar 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 °C' de yürütüldü.

#### **3.6.5. Pelet miktarının lakkaz üretimi üzerine etkisinin saptanması**

Bölüm 3.3' de belirtildiği gibi hazırlanan *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletlerinin kuru ağırlıkları sırası ile 0.23, 0.48, 0.68 g ve 0.21, 0.44, 0.70 g olacak şekilde 250 mL' lik erlenlere tartılarak kondu. Üzerlerine 50 mL STO ve STO+0.5 mM

Cu besiyerleri ilave edilerek 30 °C' de, 150 rpm' de inkübe edildi ve her 24 saatte lakkaz aktivitesi ölçüldü.

### **3.6.6. İnkübasyon sürelerinin lakkaz üretimi üzerine etkisinin saptanması**

*Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletleri 250 mL' lik erlenlere aktarıldı ve üzerlerine 50 mL STO ve STO+0.5 mM Cu besiyerleri ilave edilerek 30 °C' de, 150 rpm çalkalama hızında inkübe edildi. İnkübasyon süresince 0., 2., 4., 6., 8., 10., 12., ve 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde steril koşullarda örnekler alınarak lakkaz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü.

### **3.7. İndükleyici Maddelerin Lakkaz Üretim Verimine Etkisinin Saptanması**

Tekrarlı kesikli süreçte gerçekleştirilen çalışmalarda besiyerlerine ilave edilen bazı indükleyicilerin lakkaz üretimi üzerine etkisini tespit etmek amacıyla STO ve STO+0.5 mM Cu ortamına farklı konsantrasyonlarda ABTS [2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)], şiringaldazin, guaiakol ve 2,5-ksilidin eklendi. Daha sonra çalışmalar optimum koşullarda tekrarlı kesikli süreçte yürütüldü.

#### **3.7.1. ABTS**

STO ve STO+0.5 mM Cu içeren kültürlerle son konsantrasyonda 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 ve 1 mM olacak şekilde ABTS steril koşullarda eklendi. Çalışmalar tekrarlı kesikli süreçte yürütüldü.

#### **3.7.2. Şiringaldazin**

STO ve STO+0.5 mM Cu ortamlarına son konsantrasyonda 0.025, 0.05, 0.1 ve 0.5 mM olacak şekilde şiringaldazin saf etil alkolde (%99.9) çözülerek steril koşullarda eklendi. Fungus peletleri ile tekrarlı kesikli süreçte çalışmalar yürütüldü.

### 3.7.3. Guaiakol

Guaiakol son konsantrasyonda 0.05, 0.1, 0.5, 1 ve 1.5 mM olacak şekilde steril koşullarda STO ve STO+0.5 mM Cu ortamlarına eklendi. *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletleri ile tekrarlı kesikli süreçte çalışmalar yürütüldü.

### 3.7.4. 2,5-ksilidin

STO ve STO+0.5 mM Cu ortamlarına 0.05, 0.1, 0.5, 1 ve 1.5 mM olacak şekilde sıvı formda olan 2,5-ksilidin (% 50 etil alkolde çözülerek) steril koşullarda eklendi. Fungus peletleri ile tekrarlı kesikli süreçte çalışmalar yürütüldü.

## 3.8. Farklı Besiyerlerinin Lakkaz Üretim Verimine Etkisinin Saptanması

### 3.8.1. Distile su ve Distile su+0.5 mM Cu

Bölüm 3.3' de belirtildiği gibi hazırlanan *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletleri sırası ile 0.68 g ve 0.70 g olacak şekilde 250 mL' lik erlenlere aktarıldı. Üzerlerine 50 mL steril distile su veya distile su+0.5 mM Cu ilave edilerek 30 °C' de, 150 rpm' de inkübe edildi ve 24 saatte bir lakkaz aktivitesi saptandı.

### 3.8.2. SDB ve SDB+0.5 mM Cu

*Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletleri sırası ile 0.68 g ve 0.70 g olacak şekilde 250 mL' lik erlenlere eklendi. Üzerlerine steril 50 mL SDB (Sabouraud Dekstroz Broth) veya SDB+0.5 mM Cu ilave edilerek 30 °C' de, 150 rpm' de inkübe edildi ve 24 saatte bir lakkaz aktivitesi saptandı.

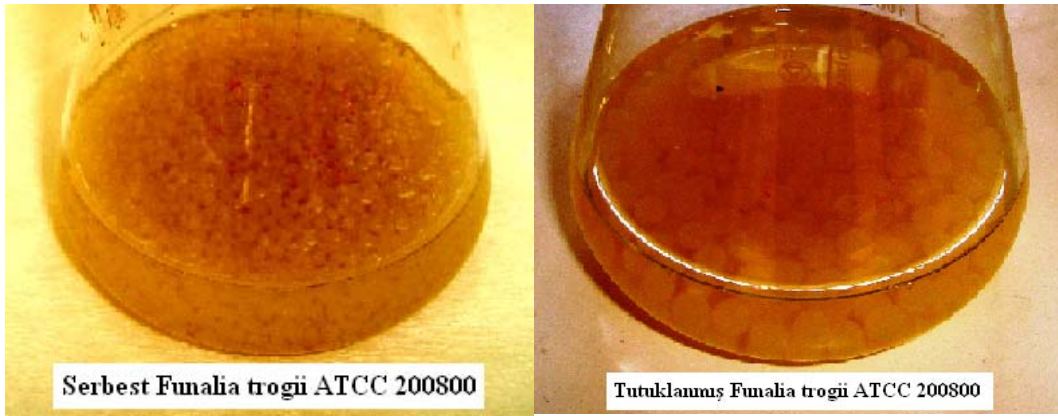
### 3.8.3. MEB ve MEB+0.5 mM Cu

*Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletleri sırası ile 0.68 g ve 0.70 g olacak şekilde 250 mL' lik erlenlere tartılarak kondu. Üzerlerine steril 50 mL MEB (Malt Ekstrakt Broth) veya MEB+0.5 mM Cu ilave edilerek 30 °C' de, 150 rpm' de inkübe edildi ve 24 saatte bir lakkaz aktivitesi saptandı.

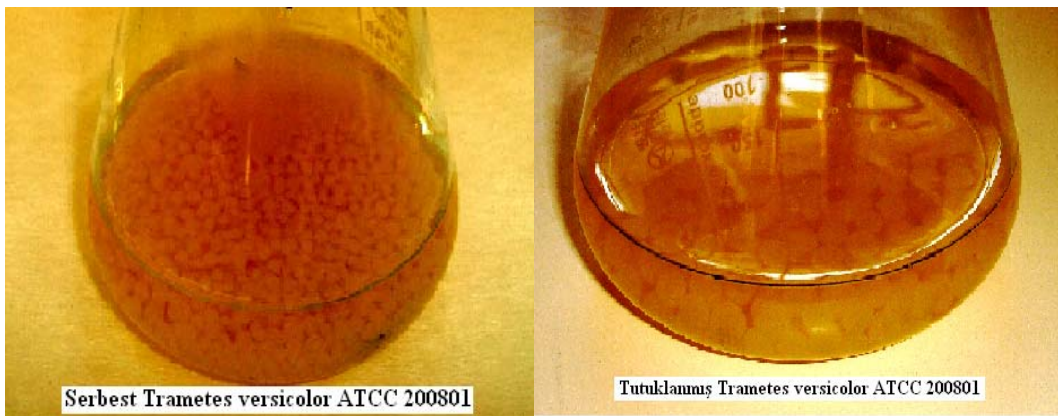
### 3.9. Fungusların Aljinat Jel İçerisine Tutuklanması

Beyaz çürükçül funguslar enzim üretimi ve çeşitli boyaların renginin giderimi gibi amaçlarla aljinat boncuklarına tutuklanarak çalışmalarda kullanılmaktadır [170].

Buna göre *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* hücreleri %1 w/v aljinat çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra düşük devirde homojenize edildi. Bu karışım, 0.1 M soğuk CaCl<sub>2</sub> çözeltisine pastör pipeti ile damlatılarak tutuklama gerçekleştirildi. Tutuklanmış olan funguslar serum fizyolojik çözeltisi (%0.9 NaCl) içerisinde bekletildi. Çalışmada kullanılacak tutuklanmış hücreler steril distile su ile yıkandıktan sonra SDB besiyerinde 24 saat inkübe edildi (Şekil 3.1, 3.2). İnkübasyon sonrası tutuklanmış hücreler steril koşullarda süzülüp uygun miktarlarda STO ve STO+0.5 mM Cu ortamlarına eklendi [54].



Şekil 3.1. Serbest ve tutuklanmış *Funalia trogii* ATCC 200800 hücrelerinin görünümü



Şekil 3.2. Serbest ve tutuklanmış *Trametes versicolor* ATCC 200801 hücrelerinin görünümü



### 3.10. Analizler

#### 3.10.1. Kültür ortamındaki lakkaz aktivitesinin tayini

Lakkaz aktivitesinin saptanması için ABTS [2,2'-Azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)] substrat olarak kullanıldı. Enzim aktivitesinin ölçümünde 833 µL sodyum asetat tamponu (100 mM, pH 5.0), 100 µL ABTS (5mM) ve uygun miktarda enzim içeren kültür sıvısı içerecek şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı [72]. Enzim aktivitesi (EC 1.10.3.2) 420 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede (Shimadzu-UV-1601, UV/Visible) 1 dakikada elde edilen absorbans değişimi olarak belirlendi ve 1 dakikada 1 µmol substratı (ABTS) ürüne dönüştüren enzim miktarı 1 ünite (U) olarak ifade edildi. Tüm çalışmalardaki enzim aktiviteleri U/mL cinsinden tanımlandı.

#### 3.10.2. Kuru ağırlığın saptanması

Bölüm 3.3' de belirtildiği gibi hazırlanan *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletleri 50 °C' ye ayarlanmış pastör fırınında (Nüve FN 500) 24 saat süresince bekletilerek kurutulup, 1 saat desikatörde bekletildikten sonra darası alınmış boş filtre kağıtlarından (Whatman No:1, Toyo Advantec, 125 mm çap) süzüldü. Daha sonra filtre kağıdı+fungus 24 saat 50 °C' de pastör fırınında bekletilerek kurutuldu. Kurutma işlemi sonrası 1 saat desikatörde bırakıldı ve sonra hassas terazide tartılarak *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletlerinin biyokütle miktarı g/50 mL olarak ifade edildi.

#### 3.10.3. Ağır metal miktarının analizi

Çalışma süresince temel besiyeri olarak kullanılan STO+0.5 mM Cu ortamındaki bakırın *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletleri tarafından ne kadarının absorplanıp ne kadarının kültür sıvısı içerisinde kaldığını saptamak amacıyla kültür sıvıları ve stok besiyerindeki bakır miktarları atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile saptandı. Buna ilaveten kontrol olarak bakır eklenmeyen stok STO ortamında ve bu ortamda inkübe edilen fungusların kültür sıvılarında bakır olup olmadığının saptanması amacıyla aynı analiz, atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılarak İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Merkezi Araştırma Laboratuvarında yaptırıldı.

#### **3.10.4. Toplam protein miktarının saptanması**

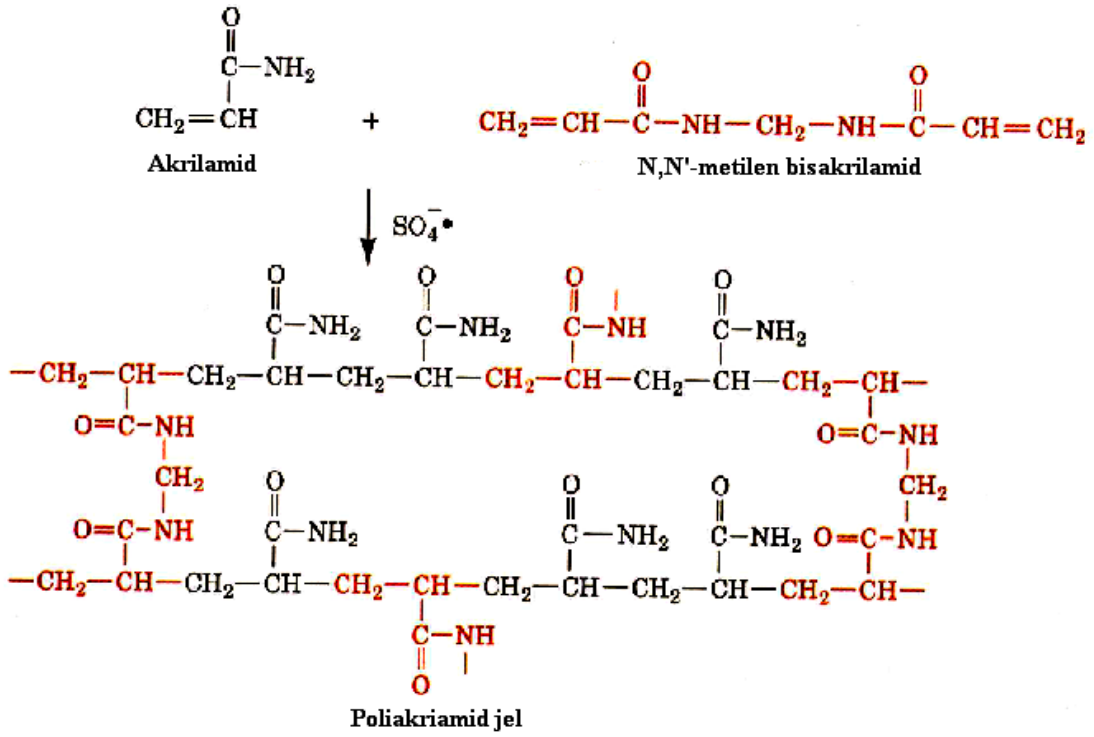
Toplam protein miktarı, mikropilaka okuyucu sistemi (Molecular Devices Corp., Versamax) kullanılarak Bradford yöntemiyle saptandı. Bunun için her bir mikropilaka kuyucuğuna 5 µL kültür sıvısı ve 250 µL Bradford ayıracı eklendi ve mikropilakalar cihaz içerisinde 15 saniye çalkalandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında (25 °C) karanlıkta bekletildi. Daha sonra renk değişimine bağlı olarak oluşan absorbans değişimi 595 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen OD değerleri, BSA (Sığır Serum Albumini) kullanılarak çizilmiş standart grafik değerleri ile karşılaştırılarak örneklerdeki toplam protein miktarları paket program (Slide) kullanılarak hesaplandı. Ölçümler üçer tekrarlı olarak yapıldı [56, 93].

#### **3.11. İstatistiksel Analiz**

Enzim aktivitelerinin hesaplanmasında istatistik paket programı olarak SPSS (SPSS 10.0 Inc., USA) programı kullanıldı.

#### **3.12. Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Çalışmaları**

Yüksek oranda lakkaz içeren kültür sıvılarından alınan örnekler SDS poliakrilamid jel elektrofrezinde yürütülmeden önce örnekler üzerine Sigma-Aldrich marka hazır örnek tamponu (Laemmli 2x konsantrasyonda) eklendi ve örnekler kaynar suda 3 dakika bekletilerek denatüre edildi. Doğal poliakrilamid jel elektrofrezinde yürütülecek örnekler üzerine ise SDS ve 2-merkaptolanol içermeyen 2x konsantrasyonda hazırlanmış örnek tamponları eklendi ve örnekler kaynar suda bekletilmedi. Doğal poliakrilamid jel elektrofrezinin jel içeriği SDS poliakrilamid jel elektrofrezinin jel içeriği ile aynı olup, %10' luk SDS çözeltisinin yerine doğal poliakrilamid jel elektrofrezinin jel ortamına aynı miktarda distile su ilave edildi (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** Akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid ve poliakrilamid jelin kimyasal yapısı [171]

Poliakrilamid jel elektroforezi çalışmalarında kullanılacak ayırma (%10) ve sıkıştırma jelleri (%4) hazırlandıktan sonra örnek tamponları eklenmiş protein standartları [Miyozin (205 kDa),  $\beta$ -Galaktozidaz (116 kDa), Fosforilaz-B (97.4 kDa), Albumin (BSA) (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Karbonik anhidraz (29 kDa), Tripsin inhibitör (20.1 kDa),  $\alpha$ -Laktalbumin (14.2 kDa)] ve kültür filtratları SDS poliakrilamid jel elektroforezinde 40 mA/jel sabit akımda yaklaşık 100 dakika, doğal poliakrilamid jel elektroforezinde ise 40 mA/jel sabit akımda yaklaşık 120 dakika süre ile elektroforez işlemine tabii tutuldu. Yürütme işlemlerinin sonucunda oluşan protein bantlarını görünür hale getirmek için SDS poliakrilamid jel elektroforezinde jellere Coomassie Brilliant Blue R-250 boyaması yapılırken, doğal poliakrilamid jel elektroforezi sonrasında ise Coomassie Brilliant Blue R-250 veya aktivite boyaması [%0.03 ABTS (w/v)] yapıldı.

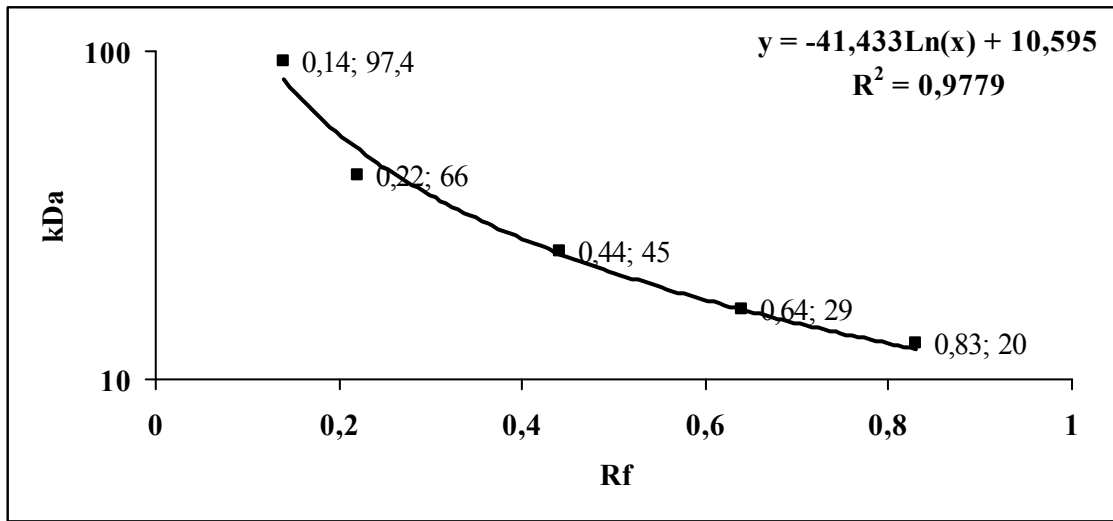
Molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerin, molekül ağırlıkları ve jeldeki göç mesafeleri ile ilişkili olarak Microsoft Office Excel 2003 programında çizilen doğrusal bir grafik yardımı ile örnek proteinin molekül ağırlığı hesaplandı.

### 3.12.1. Hesaplama yöntemi

1. Boyanın (bromfenol mavi) uygulama noktasından elektroforez sonunda göç ettiği noktaya kadar olan mesafesi ölçüldü.
2. Molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerin uygulama noktasından elektroforez sonunda göç ettiği noktaya kadar olan mesafeleri ölçüldü.
3. Her standart protein için Rf değeri hesaplandı. Bunun için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$Rf = \frac{\text{Proteinin göç ettiği mesafe}}{\text{Boyanın göç ettiği mesafe}}$$

4. Microsoft Office Excel 2003 programında, X eksenini Rf, Y eksenini ise moleküler ağırlık olacak şekilde standart eğri grafiği çizildi (Şekil 3.4).
5. Bilinmeyen proteinin Rf değeri hesaplanarak çizilen grafik yardımı ile moleküler ağırlığı hesaplandı [157].



Şekil 3.4. Molekül ağırlıkları (kDa) belli olan proteinlerin standart eğri grafiği

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Lakkaz hem fenolik hem de fenolik olmayan bileşikleri oksitleyebilir. Lakkaz enzimi geniş substrat özgüllüğünden dolayı pek çok endüstriyel alanda farklı amaçlarla kullanılabilir [72].

Lakkaz kullanılarak kağıt, tekstil ve petrokimya endüstrisi atık sularının detoksifikasyonu, boya ve tekstil fabrikası atıksularının renginin giderimi, pestisit transformasyonu ve toprak kirleticilerinin biyolojik iyileştirilmesi sağlanabilmektedir. Ayrıca kağıt hamurunun ağartılması, lakkaz tabanlı biyosensör yapımı, organik madde üretimi ve gıda endüstrisinde de lakkaz enzimi kullanılmaktadır. Son yıllarda bazı su arıtım sistemlerinde temizleyici ajan, anti-kanser ilaçlarının üretiminde katalizör ve kozmetik ürünlerinin bileşeni olarak da lakkaz kullanıldığı rapor edilmektedir [99].

Beyaz çürükçül funguslar en iyi lakkaz üreticisi organizmalar olsa da ürettikleri lakkaz miktarı endüstriyel alanlarda kullanım için yeterli değildir. Lakkaz enziminin farklı alanlarda uygulanabilmesi için yüksek oranda lakkaz üretimine ihtiyaç vardır. Bu nedenle en uygun lakkaz üretim koşullarının saptanması gereklidir. Bu amaçla çalışmalarda iyi lakkaz üreticileri olan *Funalia trogii* ATCC 200800 ve *Trametes versicolor* ATCC 200801 peletleri kullanılarak lakkaz üretimi için en uygun koşullar saptanmaya çalışıldı. En uygun koşulların araştırıldığı çalışmalar tekrarlı kesikli süreçte gerçekleştirilmiş olup, öncelikle STO ortamlarına çeşitli konsantrasyonlarda bakır eklenerek en uygun bakır konsantrasyonu saptandı. Daha sonra optimizasyon çalışmaları en uygun konsantrasyonda (0.5 mM) bakır ilave edilmiş ve ilave edilmemiş STO ortamlarında gerçekleştirildi. En uygun koşulların araştırıldığı çalışmalarda, farklı çalkalama hızları, ortam pH' ları, inkübasyon sıcaklıkları, pelet miktarları ve zaman aralıkları test edildi. Çalışmanın bu aşamasından sonra optimum koşullarda fungusların lakkaz üretimlerini artıracak çeşitli indükleyici maddeler (ABTS, şiringaldazin, guaiakol ve 2,5-ksilidin) farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde besiyerlerine ilave edilerek, *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletlerinin en uygun lakkaz üretim koşulları saptandı.

Fungus peletlerinin STO ve STO+Cu dışında farklı ortamlarda lakkaz üretim kapasitelerini saptayabilmek amacıyla funguslar Distile su, Distile su+Cu, SDB, SDB+Cu, MEB ve MEB+Cu gibi ortamlarda tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilerek fungusların bu ortamlardaki lakkaz üretim yetenekleri saptandı.

## 4.1. Tekrarlı Kesikli Süreçte Yürütülen Optimizasyon Çalışmaları

### 4.1.1. Bakır'ın *F. trogii* ve *T. versicolor*'un lakkaz üretimi üzerine etkisi

Bakır lakkaz enziminin kofaktörü olması nedeni ile pek çok çalışmada lakkaz üretimini artırmak için test edilen ağırmetallerin başında gelir. Ancak her ağır metal gibi bakır da kullanılan organizmaya bağlı olarak belirli bir konsantrasyonun üzerinde toksik etki göstererek gelişimi ve dolayısıyla da enzim üretimini baskılar. Bu nedenle enzim üretimini artırmak için kullanılan bakırın optimum konsantrasyonunu tespit etmek gerekir. Buna göre farklı bakır konsantrasyonlarının *F. trogii* ve *T. versicolor*'un lakkaz üretim verimi üzerine etkisini ve en uygun bakır konsantrasyonunu saptayabilmek amacıyla son konsantrasyonda 0.25, 0.5, 1, 2, 5 mM içerecek şekilde STO+Cu hazırlanarak peletler bu ortamlara ilave edildi ve funguslar 11 gün boyunca tekrarlı kesikli olarak inkübe edilerek lakkaz aktivitesi ölçüldü. Yapılan ölçümler sonucunda hem *F. trogii* hem de *T. versicolor* için en yüksek enzim aktivitesi inkübasyonun 6. gününde STO+0.5 mM Cu ortamında belirlendi. (Çizelge 4.1, 4.2). Buna göre yapılan çalışmalarda temel besiyeri olarak STO (kontrol) ve STO+Cu (0.5 mM) kullanıldı.

**Çizelge 4.1.** Bakır eklenmiş STO' da *F. trogii* peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL)

İnkübasyon						
Zamanı (Gün)	STO	STO+0.25 mM Cu	STO+0.5 mM Cu	STO+1 mM Cu	STO+2 mM Cu	STO+5 mM Cu
1.	0.53±0.03	9.28±1.19	20.97±1.82	11.07±0.34	7.17±0.50	4.18±0.14
2.	0.60±0.01	12.94±1.53	26.38±1.31	16.34±0.79	10.56±0.34	7.25±0.11
3.	0.66±0.02	19.07±1.04	28.60±1.18	24.35±0.67	16.21±0.54	3.36±0.21
4.	0.74±0.02	22.66±1.22	31.94±0.83	28.70±0.53	18.81±0.62	1.14±0.16
5.	0.82±0.02	25.75±1.78	37.72±2.06	27.82±1.14	17.55±0.49	0.72±0.12
6.	0.81±0.04	21.20±0.89	40.29±1.97	26.37±0.93	16.82±0.25	0.54±0.25
7.	0.74±0.05	17.31±0.60	37.33±1.83	25.26±1.79	13.81±0.59	0.36±0.17
8.	0.60±0.02	12.57±0.46	17.01±1.06	17.33±1.64	10.99±0.21	0.25±0.06
9.	0.49±0.03	4.10±0.73	6.36±0.29	6.85±1.09	2.83±0.08	0.23±0.08
10.	0.31±0.01	3.59±0.25	4.57±0.15	3.13±0.21	0.74±0.08	0.16±0.02
11.	0.24±0.01	1.03±0.07	2.19±0.11	0.79±0.04	0.26±0.01	0.11±0.05

**Çizelge 4.2.** Bakır eklenmiş STO' da *T. versicolor* peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL)

İnkübasyon						
Zamanı (Gün)	STO	STO+0.25 mM Cu	STO+0.5 mM Cu	STO+1 mM Cu	STO+2 mM Cu	STO+5 mM Cu
1.	0.42±0.01	1.44±0.29	3.60±0.20	2.49±0.22	0.58±0.04	0.13±0.01
2.	0.45±0.01	2.11±0.29	4.13±0.12	2.85±0.15	1.07±0.03	0.19±0.02
3.	0.51±0.01	2.63±0.18	5.19±0.45	3.46±0.36	1.67±0.16	0.18±0.01
4.	0.54±0.03	3.07±0.31	5.78±0.35	3.89±0.09	2.07±0.15	0.14±0.02
5.	0.60±0.04	3.54±0.41	6.33±0.10	4.31±0.34	1.50±0.25	0.06±0.02
6.	0.53±0.01	4.48±0.30	10.25±0.30	4.98±0.40	0.60±0.01	0.03±0.01
7.	0.48±0.03	3.64±0.26	9.53±0.48	4.67±0.37	0.23±0.02	0.02±0.00
8.	0.43±0.03	2.38±0.17	4.75±0.63	1.75±0.13	0.15±0.01	0.01±0.01
9.	0.30±0.06	0.65±0.07	2.93±0.33	0.94±0.06	0.07±0.01	0.01±0.00
10.	0.19±0.03	0.44±0.08	1.54±0.15	0.64±0.06	0.06±0.01	0.01±0.00
11.	0.14±0.01	0.34±0.03	0.69±0.12	0.48±0.07	0.04±0.00	0.01±0.00

Revankar ve Lele (2006) tarafından yapılan benzer bir çalışmada *WR-1* beyaz çürükçül fungusunun üreme ortamına (pH 5.0) 0.5, 1, 2, 3, 4 ve 5 mM konsantrasyonlarda bakır sülfat ilave edilmiş ve fungus 150 rpm çalkalama hızında 28 °C (±4 °C)' de 10 gün boyunca inkübe edilmiş ve her 24 saatte bir lakkaz aktivitesi ölçülmüştür. En yüksek enzim aktivitesinin 1 mM bakır ilave edilmiş ortamda 410 U/mL olduğu ve bakır konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinde düşüş gözlemlendiği rapor edilmiştir [32].

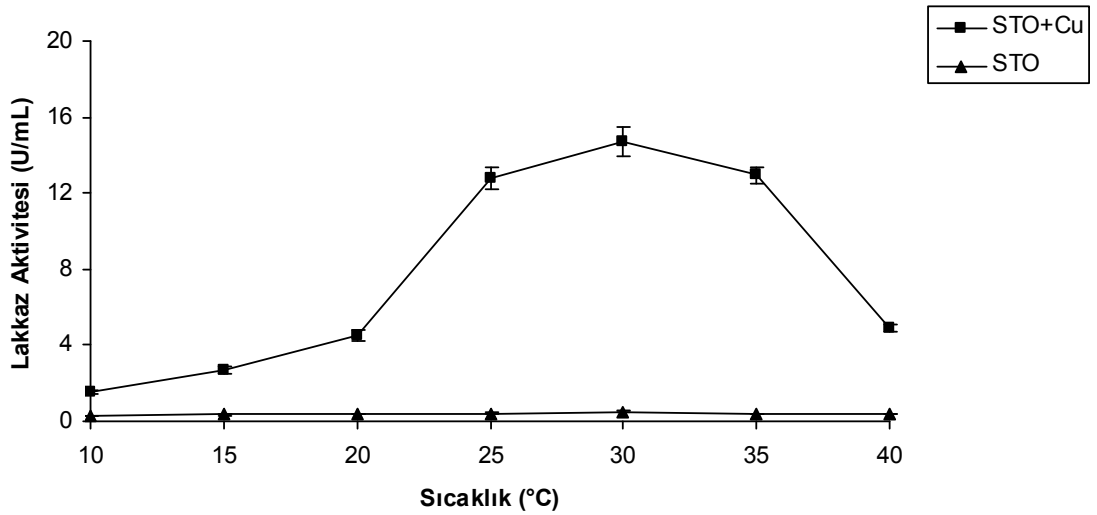
Janusz vd. (2006) tarafından *Rhizogonia praticola* kullanılarak yapılan bir çalışmada fungusun kültür ortamına 5, 10, 15, 25, 50, 100, 150, 200 ve 300 µM bakır ilave edilmiş ve en yüksek lakkaz aktivitesinin 5 µM bakır ilave edilmiş ortamda 3. günde yaklaşık 1000 nkat/L olduğu saptanmıştır. Artan bakır konsantrasyonlarında (10 µM' dan 300 µM' a) lakkaz üretiminin baskılandığı ifade edilmektedir [141].

#### 4.1.2. İnkübasyon sıcaklığının *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi

İnkübasyon sıcaklığı fungusun gelişimini etkilediği için enzim üretimini [172, 173], kültür sıvısı içerisindeki enzimin stabilitesini etkilediği için de enzim aktivitesini

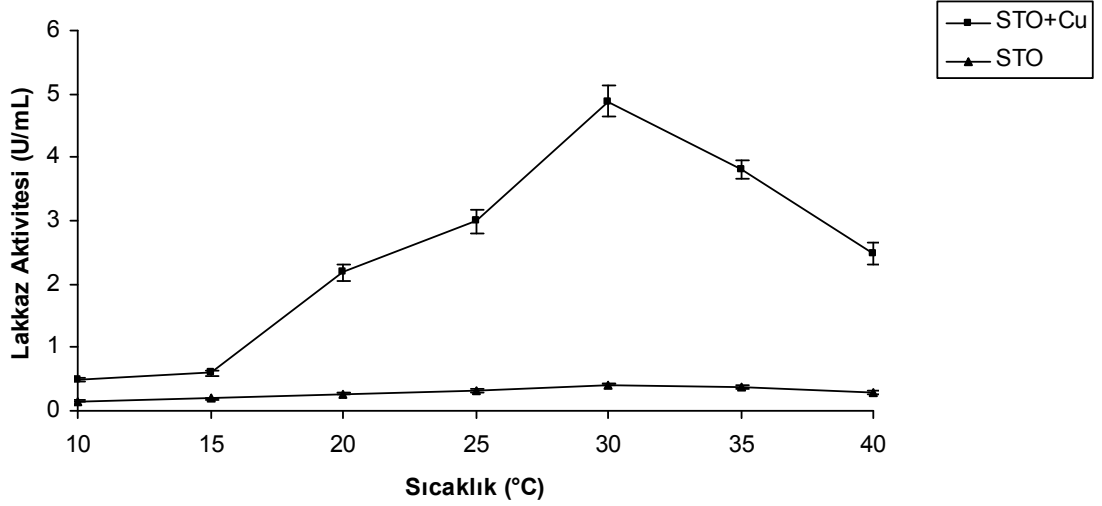
etkileyen önemli bir faktördür. Pek çok enzim izole edildiği organizma türüne bağlı olarak optimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık değerine sahiptir [172].

Hem *F. trogii* hem de *T. versicolor* peletleri için en uygun enzim üretim sıcaklığının tespit edilebilmesi için yapılan çalışmada funguslar farklı sıcaklıklara ayarlanmış inkübatörlerde 150 rpm çalkalama hızında inkübe edilerek enzim aktivitesi ölçüldü. Yapılan çalışmada öncelikle farklı sıcaklıkların 24 saatlik inkübasyon sürecinde tekrarlı kesikli süreçte STO ve STO+Cu besiyerlerinde inkübe edilen fungusların lakkaz üretimi üzerine etkisi araştırıldı. Yirmi dört saatlik inkübasyon periyodunda STO ve STO+Cu besiyerlerinde 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40 °C' lere inkübe edilen *F. trogii* ve *T. versicolor*' un lakkaz üretiminin en yüksek olduğu sıcaklık derecesinin 30 °C olduğu saptandı. Enzimin kofaktörü olan bakırın ilave edildiği STO+Cu ortamında STO ortamına göre her iki fungusun da çok daha yüksek oranda lakkaz ürettiği belirlendi. STO+Cu ortamında 30 °C' de inkübe edilen *F. trogii*' nin lakkaz aktivitesi 14.71 U/mL iken, *T. versicolor*' un enzim aktivitesi ise 4.89 U/mL olarak saptandı (Şekil 4.1, 4.2).



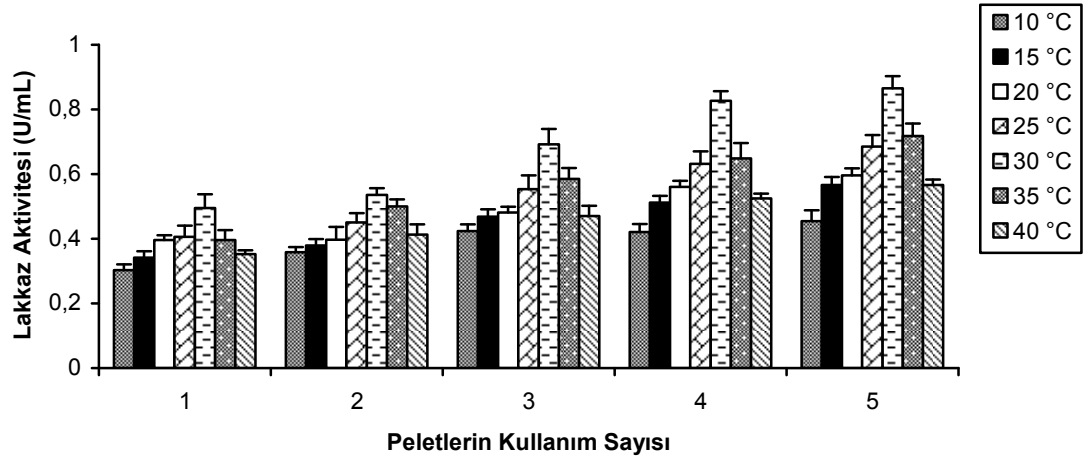
**Şekil 4.1.** Farklı inkübasyon sıcaklıklarının STO ve STO+Cu besiyerlerinde 24 saat inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi



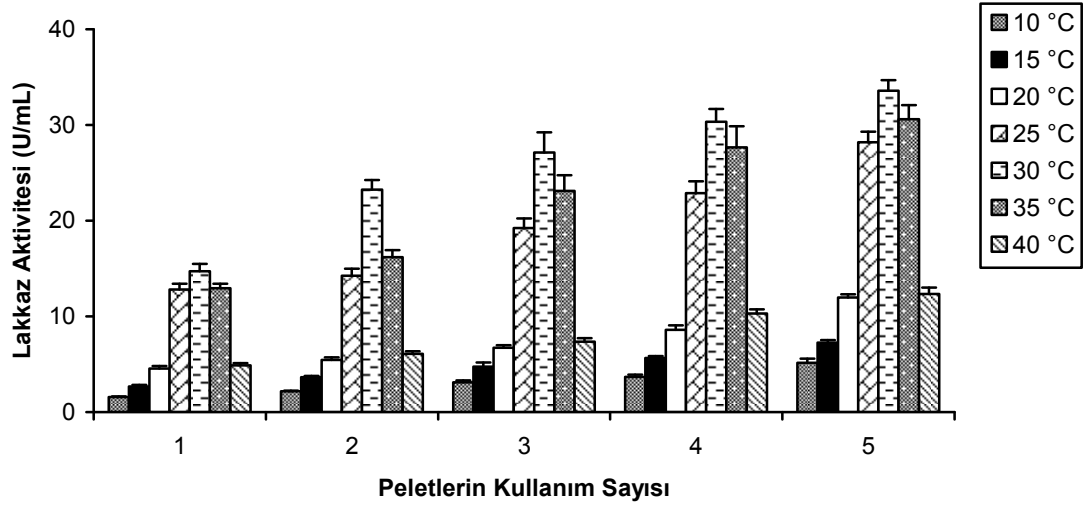


**Şekil 4.2.** Farklı inkübasyon sıcaklıklarının 24 saatlik inkübasyon sürecinde STO ve STO+Cu besiyerlerinde 24 saat inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi

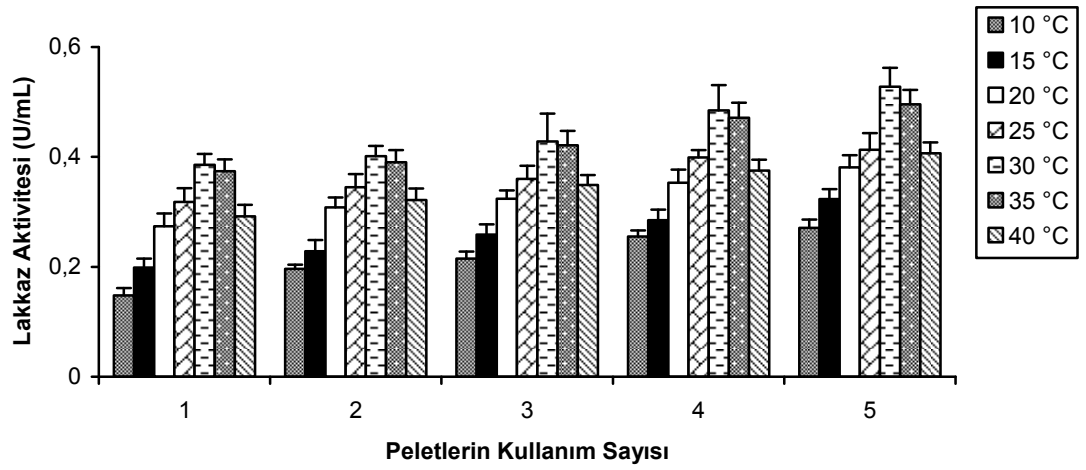
Çalışmalar sonucunda tekrarlı kesikli süreçte de en uygun sıcaklık aralığının 30 °C olarak gözlendi (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6). Yapılan çalışma sonucunda, hem *F. trogii* hem de *T. versicolor* için en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 5. gününde 30 °C’ de ve STO+Cu besiyerinde sırasıyla 33.59 ve 10.95 U/mL olarak saptandı (Şekil 4.4, 4.6).



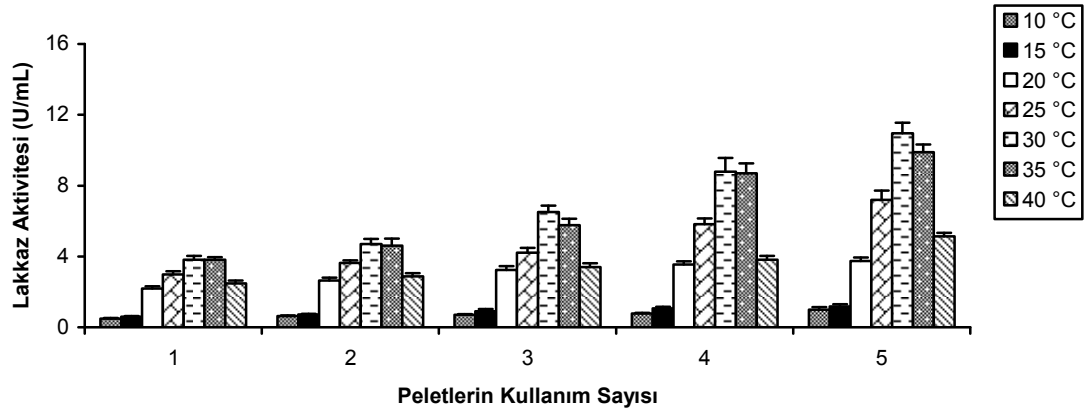
**Şekil 4.3.** Farklı inkübasyon sıcaklıklarının STO besiyerinde inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi



Şekil 4.4. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının STO+Cu besiyerinde üretilen *F. trogii* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi



Şekil 4.5. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının STO besiyerinde üretilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi



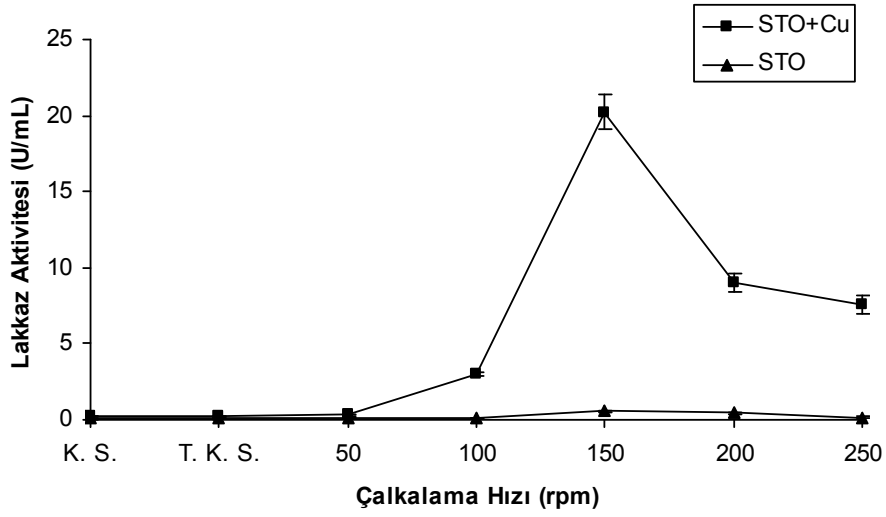
**Şekil 4.6.** Farklı inkübasyon sıcaklıklarının STO+Cu besiyerinde inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi

Wang vd. (2006) tarafından yapılan benzer bir çalışmada MSB ortamında inkübe edilen *Monotospora* sp. 20, 24, 28, 32, 36, 40 °C’ de inkübe edilmiş ve en uygun inkübasyon sıcaklığı 30 °C olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar fungusun optimum koşullar altında en yüksek 13.55 U/mL lakkaz ürettiğini rapor etmiştir [174].

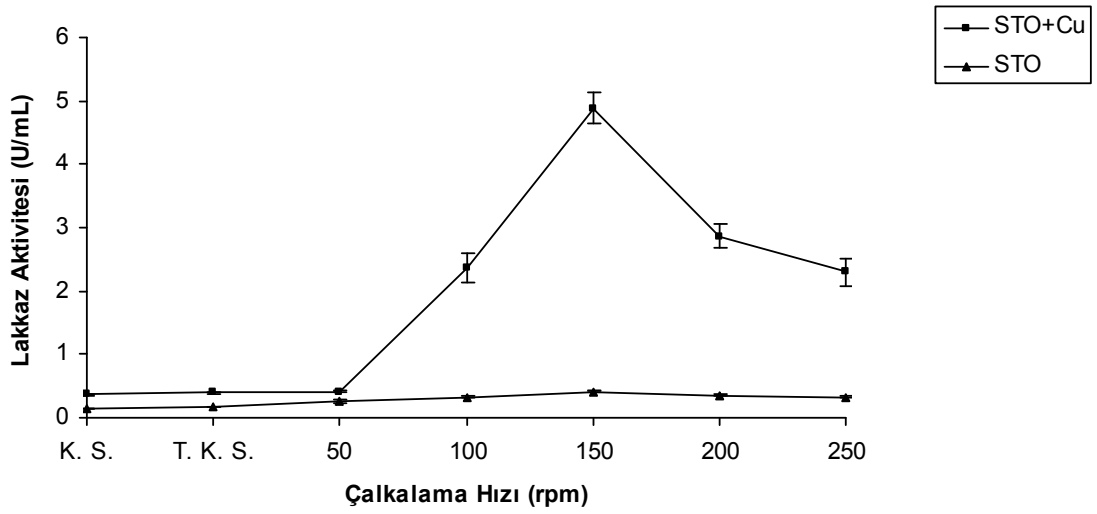
#### 4.1.3. Çalkalama hızının *F. trogii* ve *T. versicolor*’ un lakkaz üretimi üzerine etkisi

Çalkalama yeterince oksijenin çözünmesi ve yeterli besin ve de oksijene ulaşılması açısından üretilen organizmaya difüze olabilmesi açısından önemli bir faktördür [172]. Ancak yüksek oranda çalkalama hızı hem organizmaya hem de sentezlenen enzimlere mekanik olarak zarar vereceğinden çalkalama hızının organizmaya ve sentezlenen enzime göre optimize edilmesi gerekir [175].

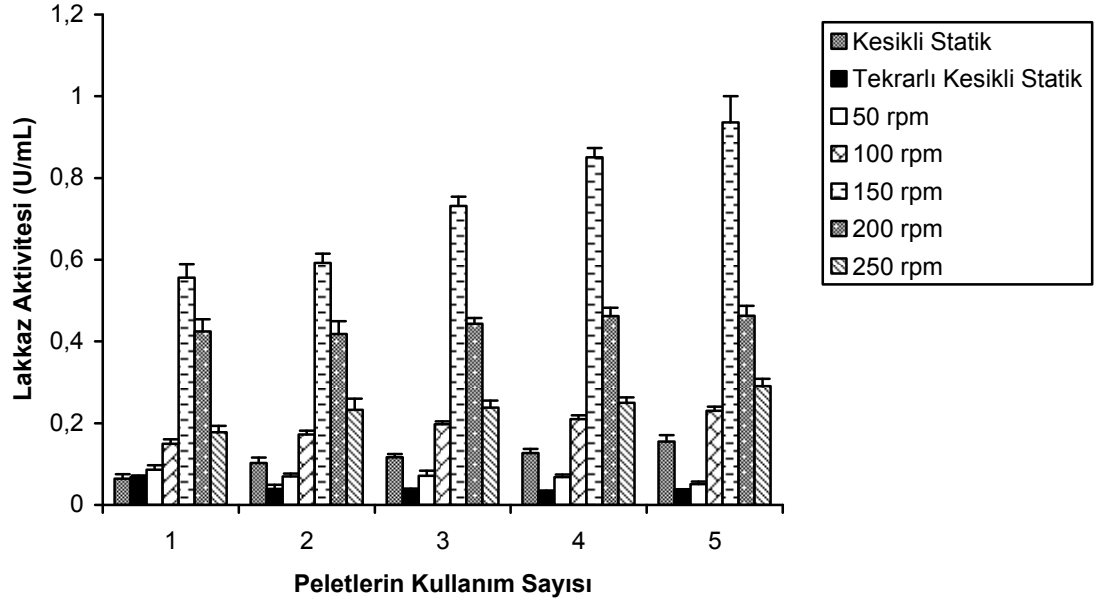
Tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretim verimi açısından en uygun çalkalama hızını tespit etmek amacıyla yapılan çalışmalarda farklı çalkalama hızlarının (statik, 50, 100, 150, 200, 250 rpm) tekrarlı kesikli inkübasyon sürecinde STO ve STO+Cu besiyerlerinde inkübe edilen peletlerin lakkaz üretimi üzerine etkisi araştırıldı. Tekrarlı kesikli statik yöntem ile karşılaştırma yapabilmek amacıyla kesikli statik süreçte de test edildi (Şekil 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12).



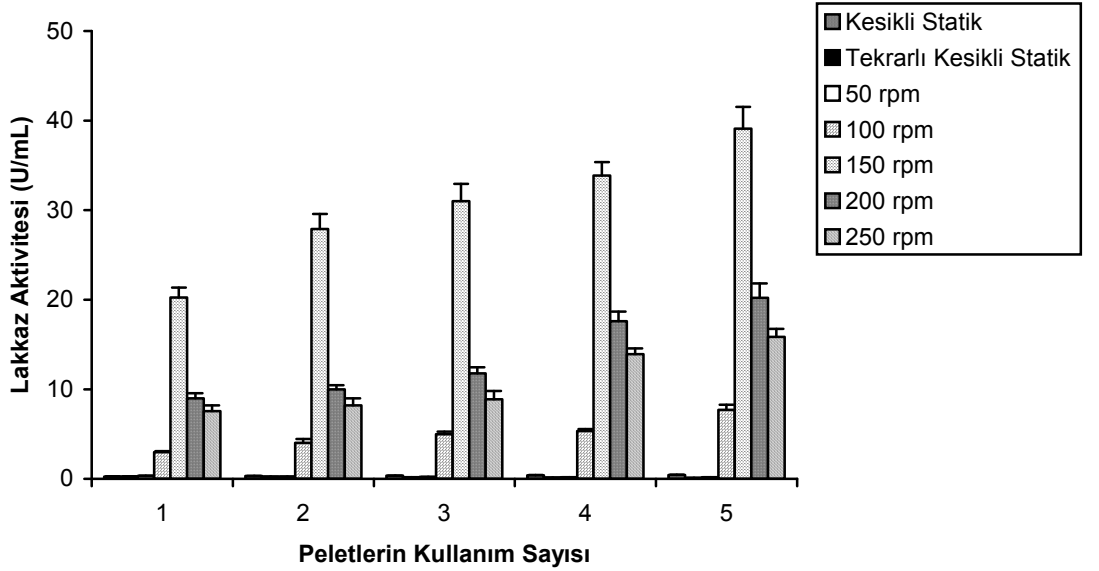
**Şekil 4.7.** Farklı çalkalama hızlarının STO ve STO+Cu besiyerlerinde 24 saat inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi



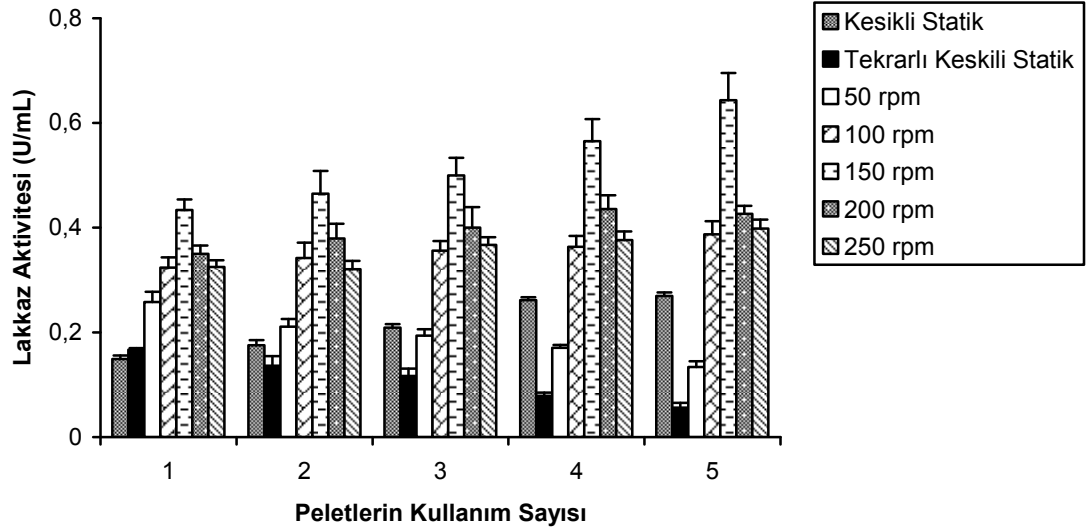
**Şekil 4.8.** Farklı çalkalama hızlarının STO ve STO+Cu besiyerlerinde 24 saat inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi



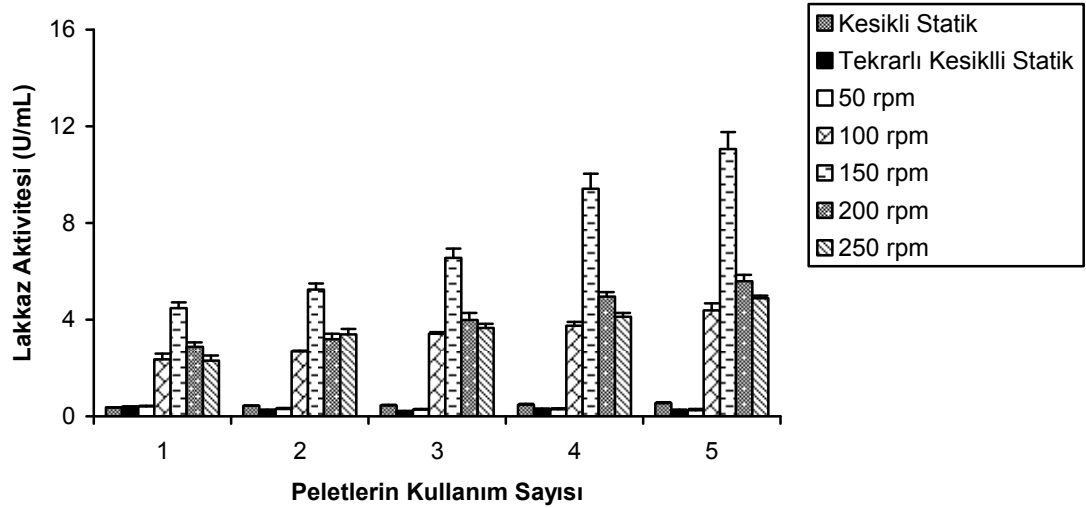
Şekil 4.9. Farklı çalkalama hızlarının STO besiyerinde inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi



Şekil 4.10. Farklı çalkalama hızlarının STO+Cu besiyerinde inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi



**Şekil 4.11.** Farklı çalkalama hızlarının STO besiyerinde inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi



**Şekil 4.12.** Farklı çalkalama hızlarının STO+Cu besiyerinde inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi

Koroleva vd. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada *Coriolus hirsutus* 075 soyu kullanılmış ve fungus 140, 160, 180, 200 rpm çalkalama hızında, 28 °C' de, 96 saat kesikli süreçte inkübe edilerek 24 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüştür. Yapılan

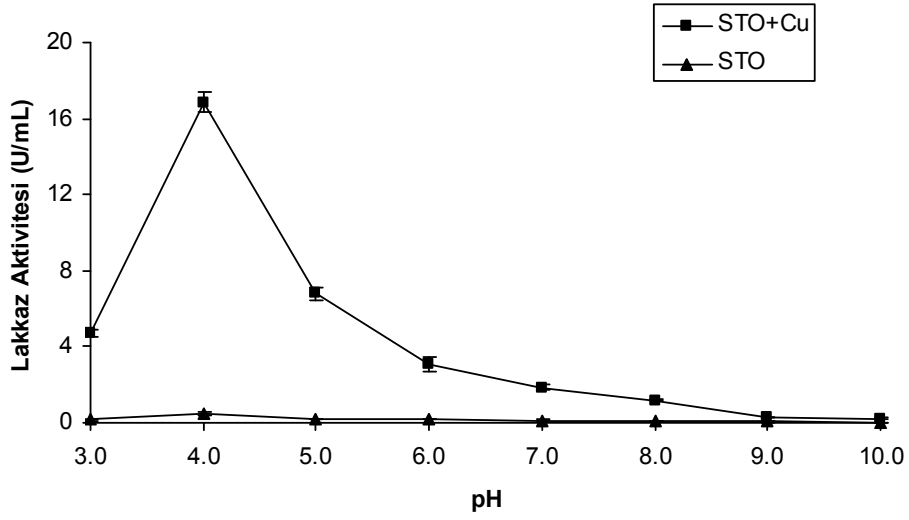
çalışma sonucunda en yüksek lakkaz aktivitesi 160 rpm çalkalama hızında, inkübasyonun 72. saatinde 83.83 U/mL olarak tespit edilmiştir [176].

#### 4.1.4. Ortam pH' sının *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi

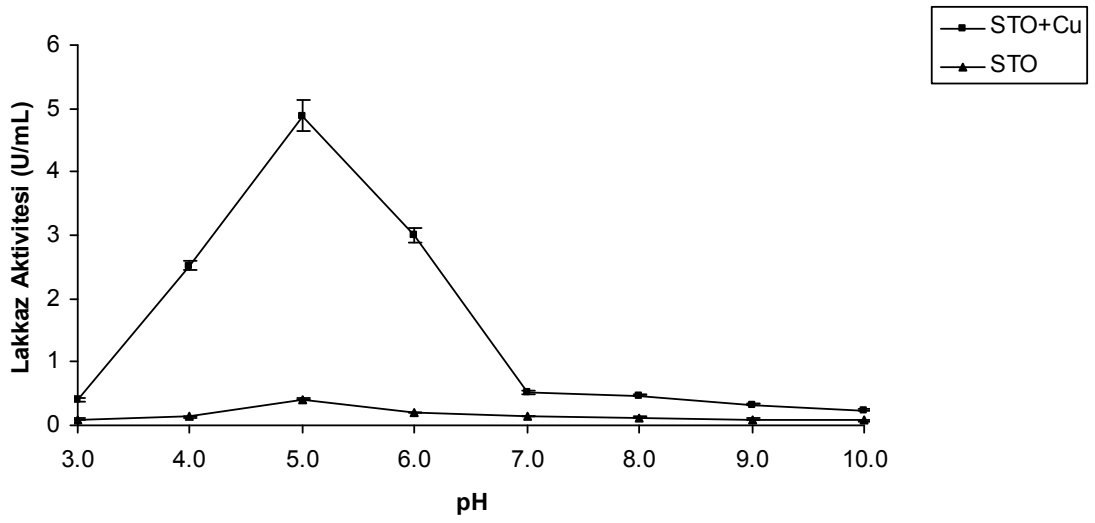
Lakkaz üretimini etkileyen diğer bir etken, besiyeri ortamının başlangıç pH' sıdır. Yapılan pek çok çalışmada beyaz çürükçül fungusların lakkaz üretimi için kültür ortamının başlangıç pH' sının asidik olması gerektiği ifade edilmektedir. Ancak lakkaz üretimi için gerekli optimum pH kullanılan fungus türüne ve kültür ortamına bağlı olarak değişmektedir. Örneğin, Vikineswary vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada *Pycnoporus sanguineus*' un üretildiği katı substrat ortamının pH' sı 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0' a ayarlanmış ve fungus 25±2 °C' de 12 gün boyunca inkübe edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda en yüksek aktivitenin inkübasyonun 10. gününde 46.5 U/g substrat olduğu, bu değerden sonra en yüksek aktivitenin pH 4.0 ortamında gözlemlendiği rapor edilmiştir [177].

Janusz vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Rhizoglyphus microsporus*' nın inkübe edildiği ortam pH' sı 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5' e ayarlanmış ve en yüksek lakkaz aktivitesinin pH 7.5' e ayarlanmış kültür ortamında 4000 nkat/L olduğu tespit edilmiştir [141].

*F. trogii* ve *T. versicolor*' un tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi açısından en uygun ortam pH' sının tespit edilmesi amacıyla STO ve STO+Cu ortamlarının pH' sı 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0' a ayarlanarak 30 °C' de fungal peletler inkübe edildi. Yapılan çalışma sonucunda *F. trogii* peletleri en yüksek lakkaz üretimini pH 4.0' a ayarlanmış STO ve STO+Cu ortamında (Şekil 4.13), *T. versicolor* peletleri ise pH 5.0' a ayarlanmış ortamda gerçekleştirdi (Şekil 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18).

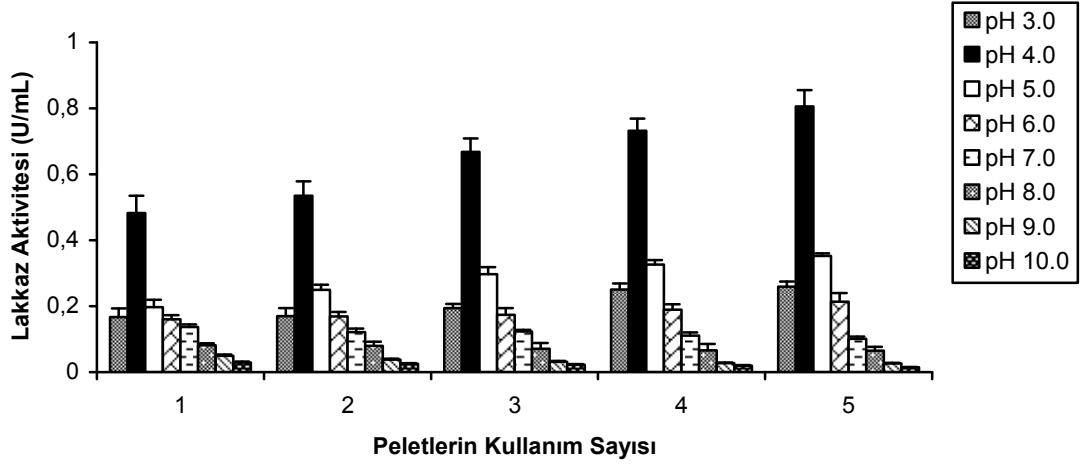


Şekil 4.13. Farklı ortam pH' larının STO ve STO+Cu besiyerlerinde 24 saat inkübe edilen *F. troglia*' nin lakkaz üretimi üzerine etkisi

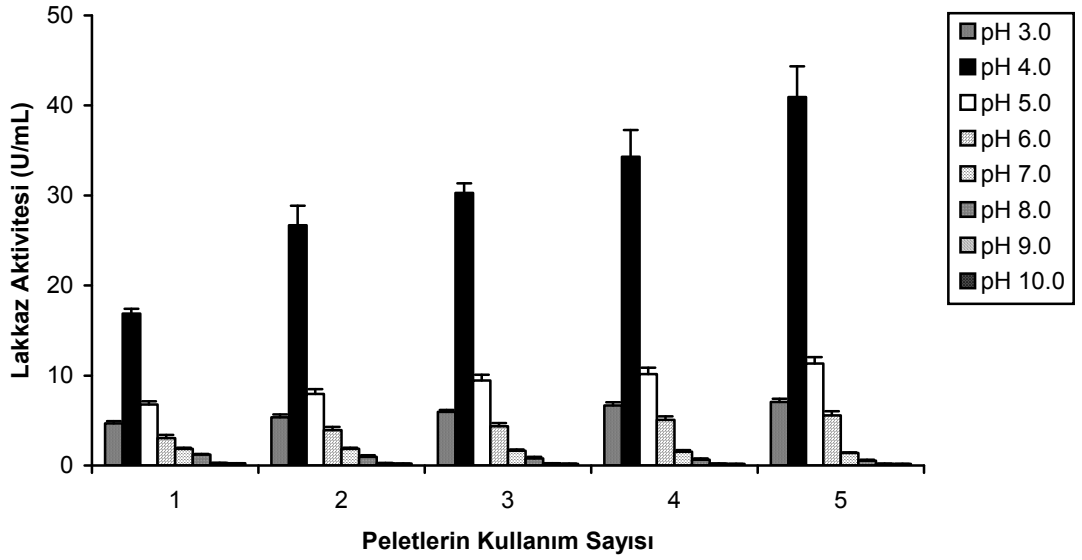


Şekil 4.14. Farklı ortam pH' larının STO ve STO+Cu besiyerlerinde 24 saat inkübe edilen üretilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisi

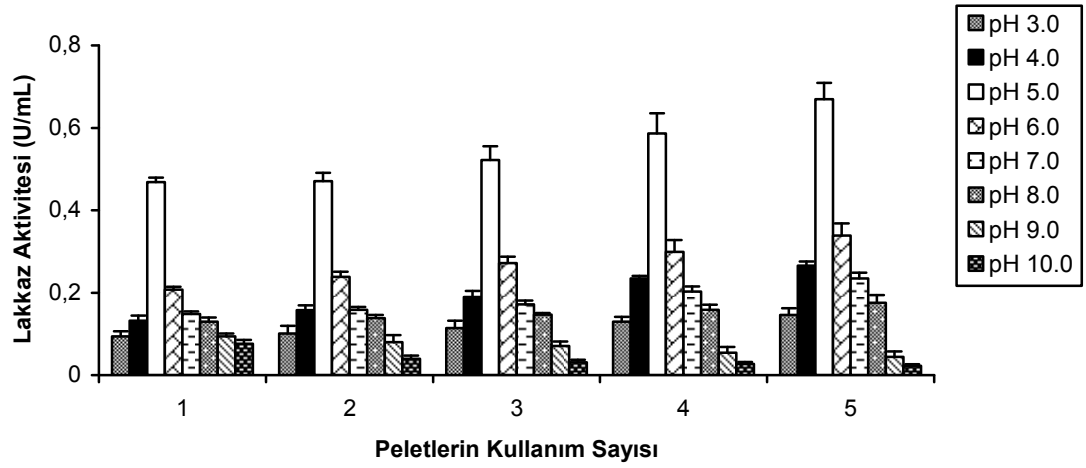




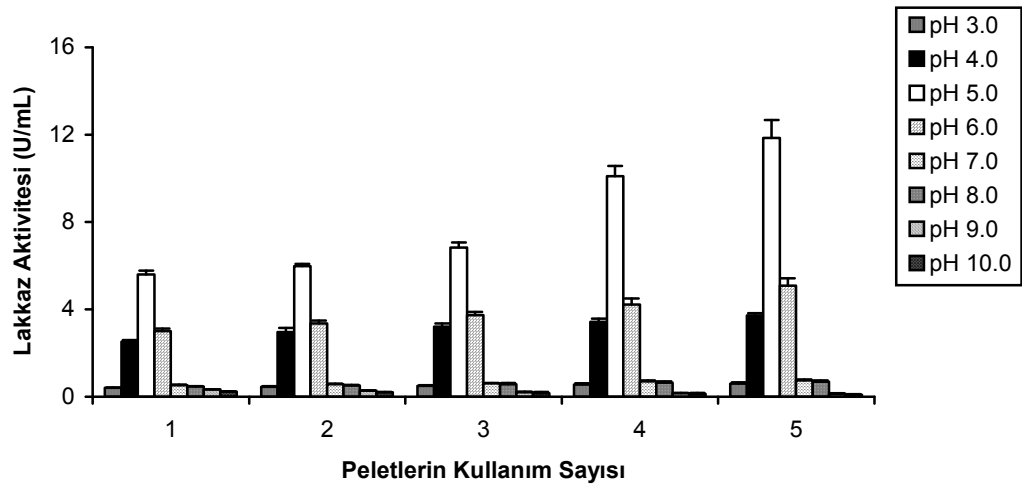
Şekil 4.15. Farklı ortam pH' larının STO besiyerinde inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi



Şekil 4.16. Farklı ortam pH' larının STO+Cu besiyerinde inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi



Şekil 4.17. Farklı ortam pH' larının STO besiyerinde inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi



Şekil 4.18. Farklı ortam pH' larının STO+Cu besiyerinde inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi üzerine etkisi

Yang vd. (2002) tarafından *Trametes* sp. kullanılarak yapılan benzer bir çalışmada fungusun kültür ortamının başlangıç pH' sı 3.0–9.0' a ayarlanmış ve fungus kesikli süreçte 28 °C' de 200 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiş ve kültür ortamının optimum pH' sı 4.5 olarak tespit edilmiş ve bu koşullarda enzim aktivitesi 14600 U/L olarak saptanmıştır [162].

#### **4.1.5. Farklı pelet miktarlarının *F. trogii* ve *T. versicolor*' un lakkaz üretimi üzerine etkisi**

Kültür ortamında bulunan pelet miktarının artışına bağlı olarak, enzim üretimi de doğrusal olarak artmaktadır. Ancak kültür ortamında bulunan pelet miktarının belirli bir oranın üzerine çıkması durumunda funguslar yeterince çalkalanamamakta buna bağlı olarak da hem oksijen hem de besin transferi güçleşmektedir. Bu durumun sonucunda da hücreler daha çabuk yaşlanarak hızlıca ölmekte ve dolayısıyla lakkaz üretim verimi de azalmaktadır. Prasad vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada poliüretan köpük üzerine tutuklanmış *Pleurotus ostraetus* 1804 soyu 0.34, 0.69, 1.04, 1.38, 1.73, 2.08, 2.42, 2.77, 3.11, ve 3.46 g yaş ağırlık/L tuz solüsyonu olacak şekilde hazırlanmış ve yapılan çalışma sonucunda en yüksek lakkaz üretimi için en uygun biyokütle konsantrasyonunun 1.38 g yaş ağırlık/L olduğu saptanmıştır [140].

*F. trogii* ve *T. versicolor*' un farklı pelet miktarlarının lakkaz üretim verimi üzerine etkisini saptayabilmek amacıyla funguslar 10, 20, 30 g yaş ağırlık/50 mL STO veya STO+Cu olacak şekilde 250 mL' lik erlenlere aktarılırken, söz konusu problemlerden dolayı 30 g yaş ağırlık üzerindeki miktarlar test edilmedi. Fungusların kuru ağırlıkları ise *F. trogii* için sırasıyla 0.23, 0.48, 0.68 g iken, *T. versicolor* için ise 0.21, 0.44, 0.70 g kuru ağırlık/50 mL STO veya STO+Cu olarak kullanıldı. Yapılan çalışma sonucunda tekrarlı kesikli süreçte *F. trogii* için en yüksek lakkaz üretimi 0.68 g/50 mL STO veya STO+Cu ortamında (Çizelge 4.3), *T. versicolor* için ise 0.70 g kuru ağırlık/50 mL STO veya STO+Cu ortamında gerçekleşti (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.3.** Farklı miktarlarda *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)

İnkübasyon						
Zamanı (Gün)	Kullanılan pelet miktarı			Kullanılan pelet miktarı		
	0.23g/50mL STO	0.48g/50mL STO	0.68g/50mL STO	0.23g/50mL STO +Cu	0.48g/50mL STO +Cu	0.68g/50mL STO +Cu
1.	0.33±0.01	0.38±0.01	0.54±0.04	7.38±0.60	14.86±0.70	22.20±1.55
2.	0.38±0.02	0.47±0.02	0.60±0.03	8.68±0.73	16.27±0.53	26.00±1.21
3.	0.41±0.03	0.52±0.02	0.66±0.02	9.94±0.30	17.98±0.79	30.39±1.22
4.	0.46±0.04	0.58±0.02	0.72±0.06	10.66±0.37	19.74±0.96	38.85±1.38
5.	0.51±0.02	0.68±0.02	0.81±0.07	11.23±0.38	21.66±1.40	39.32±0.97

**Çizelge 4.4.** Farklı miktarlarda *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)

İnkübasyon						
Zamanı (Gün)	Kullanılan pelet miktarı			Kullanılan pelet miktarı		
	0.21g/50mL STO	0.44g/50mL STO	0.70g/50mL STO	0.21g/50mL STO+Cu	0.44g/50mL STO+Cu	0.70g/50mL STO+Cu
1.	0.16±0.00	0.31±0.01	0.36±0.02	2.31±0.18	3.90±0.15	5.64±0.36
2.	0.18±0.00	0.33±0.00	0.41±0.02	2.75±0.25	4.57±0.21	6.18±0.40
3.	0.21±0.01	0.37±0.01	0.46±0.02	3.27±0.24	5.32±0.29	8.07±0.44
4.	0.24±0.01	0.40±0.01	0.53±0.03	3.92±0.13	6.57±0.39	10.17±0.78
5.	0.25±0.02	0.41±0.02	0.60±0.04	4.36±0.16	7.08±0.34	11.04±1.01

#### 4.2. *F. trogii* ve *T. versicolor* Peletlerinin Farklı İnkübasyon Süreleri ve Süreçlerinde Lakkaz Üretimi

Çalışmanın bu kısmında iki farklı deney düzeneği hazırlanarak fungus peletlerinin farklı inkübasyon süreçlerinde lakkaz üretim verimi saptandı. Çalışmanın birinci aşamasında hem kesikli süreç hem de tekrarlı kesikli süreçte peletler inkübe edildi (Çizelge 4.5, 4.6). Kesikli süreçte STO ve STO+Cu ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 120. saatinde sırasıyla 0.43 ve 10.04 U/mL iken, tekrarlı kesikli metot ile STO ve STO+Cu ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun yine 120. saatinde sırasıyla 0.85 ve 37.85 U/mL olarak belirlendi (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** Kesikli ve tekrarlı kesikli süreçte *F. trogii* peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL)

İnkübasyon Zamanı (Saat)	Kesikli süreç		Tekrarlı kesikli süreç	
	0.68g/50mL STO	0.68g/50mL STO+Cu	0.68g/50mL STO	0.68g/50mL STO+Cu
0.	0.04±0.00	0.06±0.01	0.01±0.00	0.06±0.00
2.	0.07±0.01	0.09±0.02	0.02±0.00	0.09±0.01
4.	0.08±0.01	0.12±0.01	0.04±0.00	0.16±0.01
6.	0.08±0.01	0.24±0.01	0.06±0.00	0.16±0.01
8.	0.09±0.01	0.54±0.02	0.09±0.01	0.18±0.01
10.	0.10±0.01	0.64±0.02	0.10±0.01	0.21±0.01
12.	0.12±0.01	0.83±0.02	0.17±0.01	0.32±0.02
24.	0.17±0.01	2.78±0.20	0.56±0.04	20.23±1.15
48.	0.24±0.01	6.47±0.20	0.66±0.03	24.83±2.40
72.	0.32±0.01	9.10±0.52	0.72±0.02	28.16±2.52
96.	0.39±0.01	9.64±0.46	0.81±0.01	32.38±2.42
120.	0.43±0.02	10.04±0.43	0.85±0.04	37.85±2.09

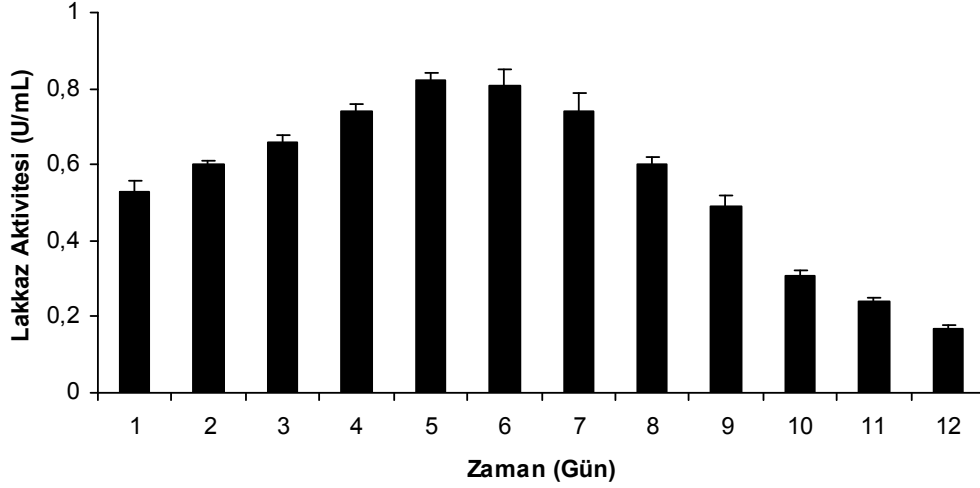
Kesikli süreçte STO ve STO+Cu ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 120. saatinde sırasıyla 0.32 ve 2.33 U/mL iken, tekrarlı kesikli süreçte STO ve STO+Cu ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun yine 120. saatinde sırasıyla 0.82 ve 13.16 U/mL olarak belirlendi (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6.** Kesikli ve tekrarlı kesikli süreçte *T. versicolor* peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL)

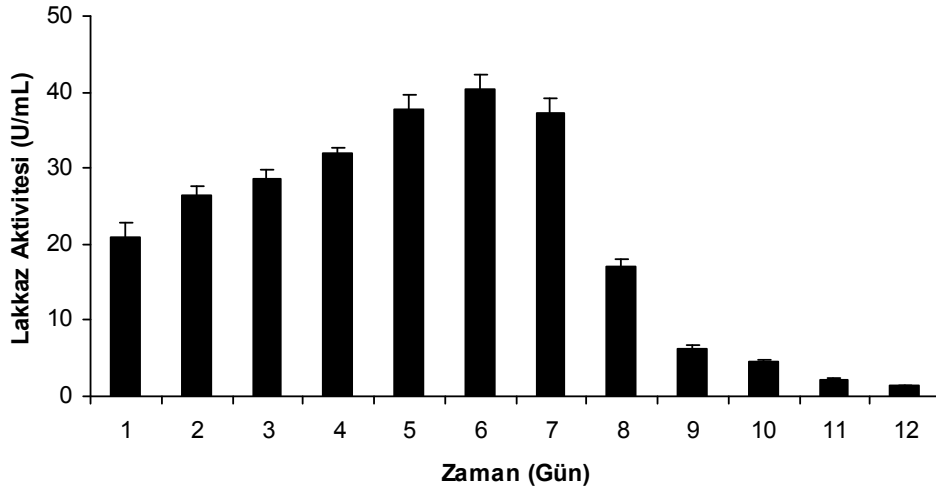
İnkübasyon Zamanı (Saat)	Kesikli süreç		Tekrarlı kesikli süre.	
	0.70g/50mL STO	0.70g/50mL STO+Cu	0.70g/50mL STO	0.70g/50mL STO+Cu
0.	0.06±0.01	0.08±0.01	0.04±0.01	0.07±0.00
2.	0.09±0.01	0.16±0.02	0.06±0.01	0.10±0.01
4.	0.13±0.01	0.19±0.01	0.08±0.01	0.12±0.01
6.	0.16±0.01	0.21±0.01	0.08±0.01	0.16±0.01
8.	0.19±0.01	0.24±0.02	0.09±0.01	0.19±0.01
10.	0.22±0.01	0.26±0.01	0.11±0.01	0.22±0.01
12.	0.23±0.01	0.30±0.02	0.13±0.01	0.29±0.02
24.	0.24±0.02	0.70±0.03	0.25±0.02	6.23±0.39
48.	0.25±0.01	1.08±0.09	0.51±0.02	6.70±0.16
72.	0.27±0.01	1.51±0.17	0.62±0.02	7.21±0.23
96.	0.29±0.02	2.17±0.11	0.73±0.03	11.67±0.24
120.	0.32±0.02	2.33±0.19	0.82±0.03	13.16±0.29

STO ve STO+Cu ortamlarında kesikli süreçte inkübe edilen *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin 0.–12. saat arasındaki lakkaz aktivitelerinin tekrarlı kesikli metot ile üretilen peletlerin enzim aktivitelerine göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu durum tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen fungusların iki saatte bir kültür sıvıları uzaklaştırılırken, kesikli süreçte inkübe edilen fungusların kültür ortamlarında sürekli enzim birikmesi ile açıklanabilir. İnkübasyon periyodu uzatıldığında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen her iki fungusun da lakkaz üretim verimi artarak kesikli süreçte inkübe edilen funguslardan daha yüksek oranda lakkaz ürettikleri saptandı. Bunun nedeni de tekrarlı kesikli süreçte ortama taze karbon ve enerji kaynağı eklenmesi olabilir.

Çalışmanın ikinci aşamasında funguslar STO ve STO+Cu besiyerlerinde 12 gün boyunca optimum koşullarda tekrarlı kesikli süreçte inkübe edildi ve 24 saatlik aralıklarla kültür sıvısı alınarak enzim aktivitesi ölçüldü. *F. trogii* için en yüksek enzim aktivitesi STO ortamında inkübasyonun 5. gününde 0.82 U/mL iken, STO+Cu ortamında inkübasyonun 6. gününde 40.29 U/mL olarak belirlendi (Şekil 4.19, 4.20).

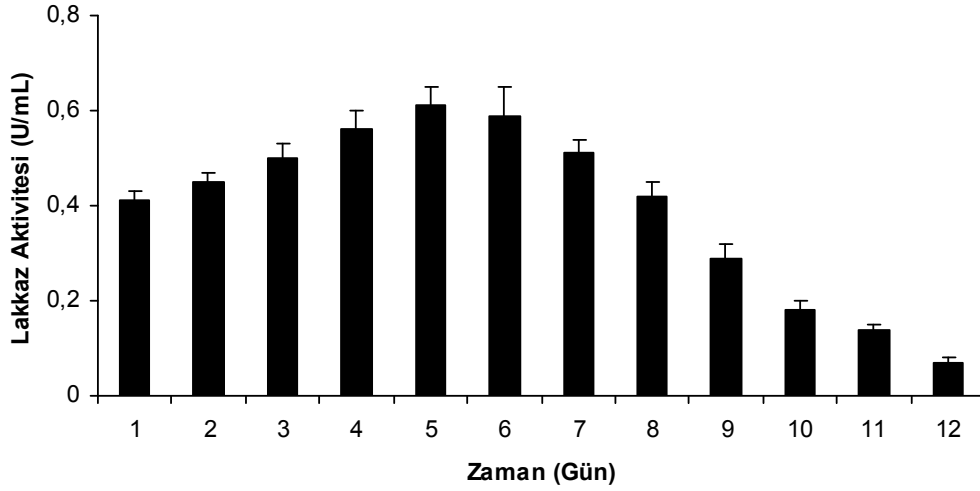


**Şekil 4.19.** Tekrarlı kesikli süreçte STO ortamında 12 gün boyunca inkübe edilen *F. troglia* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)

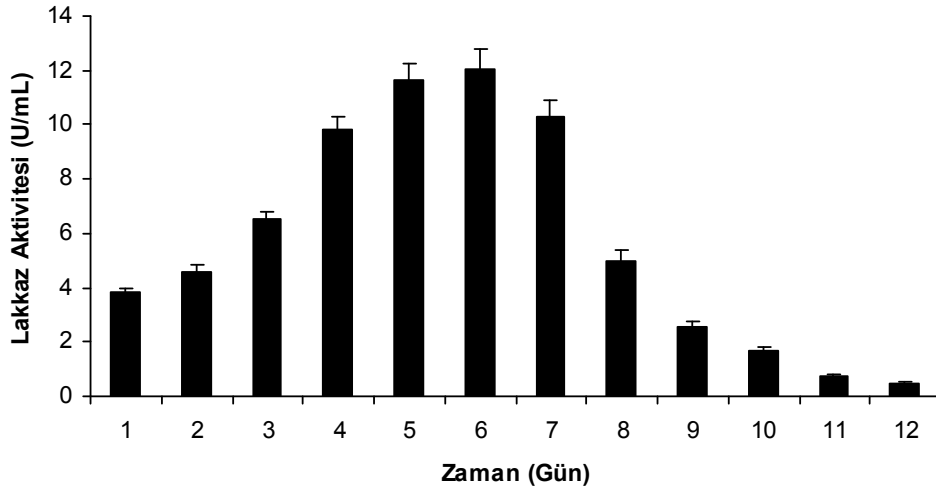


**Şekil 4.20.** Tekrarlı kesikli süreçte STO+Cu ortamında 12 gün boyunca inkübe edilen *F. troglia* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)

*T. versicolor* için ise en yüksek enzim aktivitesi STO ortamında inkübasyonun 5. gününde 0.61 U/mL iken, STO+Cu ortamında inkübasyonun 6. gününde 12.08 U/mL olarak belirlendi (Şekil 4.21, 4.22).



**Şekil 4.21.** Tekrarlı kesikli süreçte STO ortamında 12 gün boyunca inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)



**Şekil 4.22.** Tekrarlı kesikli süreçte STO+Cu ortamında 12 gün boyunca inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)

Tekrarlı kesikli süreçte STO+Cu ortamında inkübe edilen *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin 12 günlük inkübasyonu sonucunda toplam lakkaz aktivitesi sırasıyla 255 ve 69 U/mL olarak saptandı.

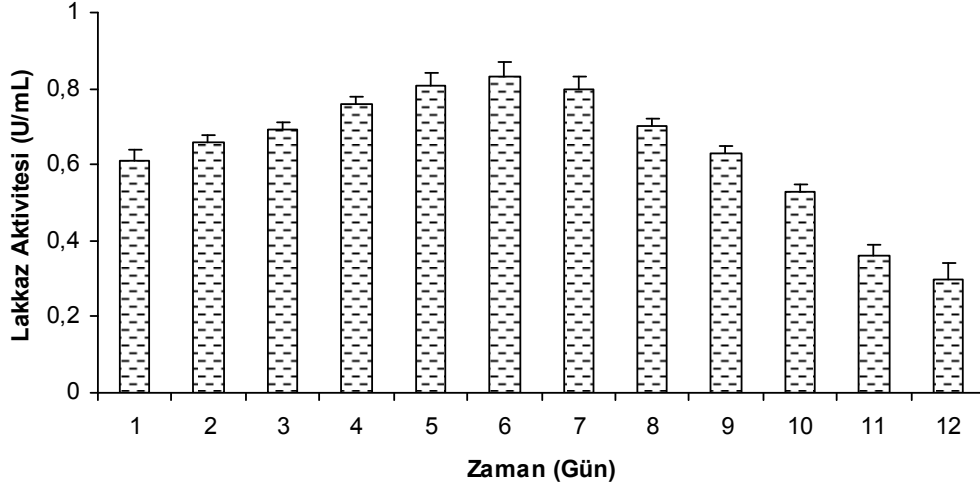


Arora ve Gill (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, inkübasyon periyodunun *Phlebia fascicularia*, *P. floridensis* ve *Dichomitus squalens* beyaz çürükçül fungus türleri tarafından üretilen lakkaz enzimleri üzerine etkisi tespit edilmiştir. Lakkaz üretimi *P. floridensis*' de 8., *P. fascicularia*' da 10., *D. squalens*' de ise 18. günlerde en yüksek seviyeye ulaşmış oysa ki en yüksek biyokütle *D. squalens*' de 16., *Phlebia* spp. için 8. günde elde edilmiştir. *Phlebia* spp.' de biyokütlenin azalışıyla birlikte 20. günde hem enzim üretiminde hem de spesifik lakkaz aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Bunun nedeninin fungal otoliz esnasında açığa çıkan az miktarda intraselüler lakkaz olabileceği rapor edilmiştir [42].

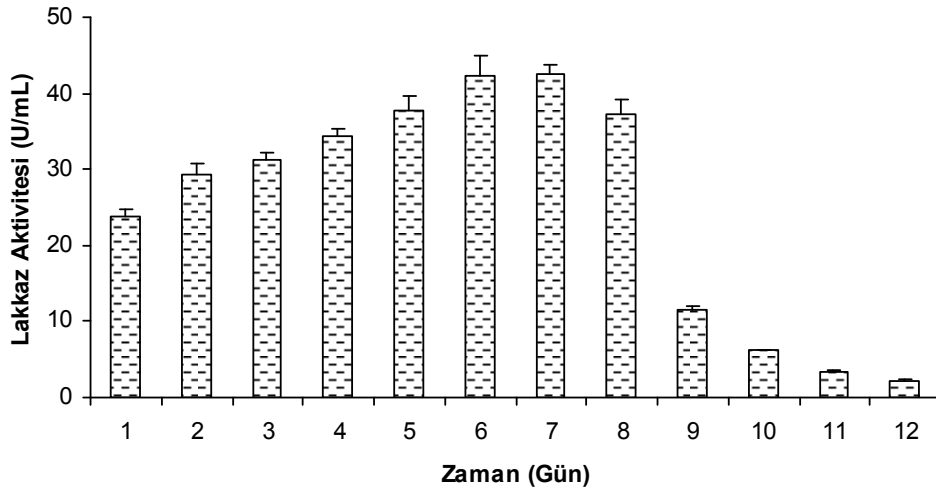
#### 4.3. Tutuklanmış *F. trogii* ve *T. versicolor* Hücreleri İle Lakkaz Üretimi

Serbest formda mikroorganizmalarla enzim üretiminin yanı sıra bazı araştırmacılar mikroorganizmaları aljinat, kitosan, kitin ve selüloz türevleri gibi doğal polimerler içerisine, bazı araştırmacılar da poliüretan köpük veya naylon sünger yüzeyine tutundurma şeklinde tutuklayarak enzim üretimini gerçekleştirmeye çalışmaktadır [95]. Park vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada *Funalia trogii* aljinat jel içerisine tutuklanmış ve en yüksek lakkaz aktivitesi 1000 U/L olarak saptanmıştır [170].

Tekrarlı kesikli süreçte serbest fungus peletleri ile tutuklanmış fungus hücrelerinin lakkaz üretim verimini karşılaştırmak amacıyla *F. trogii* ve *T. versicolor* hücreleri aljinat jel içerisine tutuklandı ve tutuklanan hücreler STO veya STO+Cu bulunan erlenler içerisinde optimum koşullar altında 12 gün boyunca inkübe edilerek 24 saat aralıklarla enzim aktivitesi saptandı. Tutuklanmış *F. trogii* için en yüksek enzim aktivitesi STO ortamında inkübasyonun 6. gününde 0.83 U/mL iken, STO+Cu ortamında inkübasyonun 7. gününde 42.46 U/mL olarak belirlendi (Şekil 4.23, 4.24).

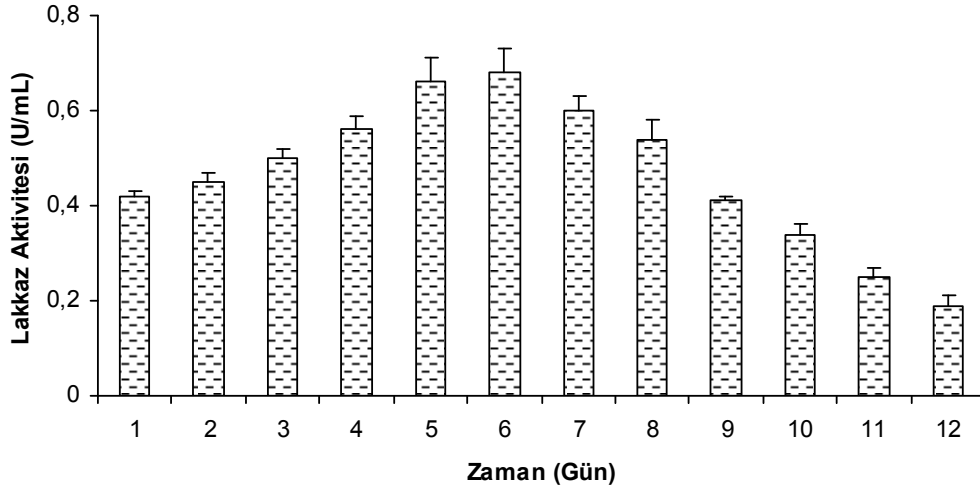


**Şekil 4.23.** Tutuklanmış *F. troglia* hücrelerinin tekrarlı kesikli süreçte STO ortamında lakkaz üretimi (U/mL)

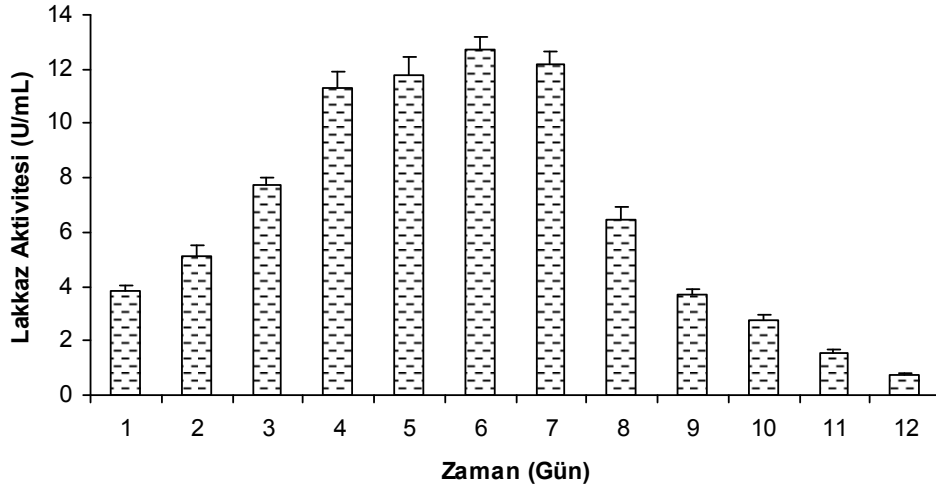


**Şekil 4.24.** Tutuklanmış *F. troglia* hücrelerinin tekrarlı kesikli süreçte STO+Cu ortamında lakkaz üretimi (U/mL)

Tutuklanmış *T. versicolor* için ise en yüksek enzim aktivitesi hem STO hem de STO+Cu ortamında inkübasyonun 6. gününde sırasıyla 0.68 U/mL ve 12.69 U/mL olarak belirlendi (Şekil 4.25, 4.26).



**Şekil 4.25.** Tutuklanmış *T. versicolor* hücrelerinin tekrarlı kesikli süreçte STO ortamında lakkaz üretimi (U/mL)



**Şekil 4.26.** Tutuklanmış *T. versicolor* hücrelerinin tekrarlı kesikli süreçte STO+Cu ortamında lakkaz üretimi (U/mL)

Tekrarlı kesikli süreçte STO+Cu ortamında inkübe edilen tutuklanmış *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin 12 günlük inkübasyonu sonucunda toplam lakkaz aktivitesi sırasıyla 302 ve 80 U/mL olarak saptandı.

#### 4.4. *F. trogii* ve *T. versicolor* Peletlerinin Farklı Ortamlarda Lakkaz Üretiminin Karşılaştırılması

Tekrarlı kesikli süreçte *F. trogii* ve *T. versicolor*' un STO veya STO+Cu dışındaki diğer kültür ortamlarında lakkaz üretme kapasitelerini tespit edebilmek amacıyla funguslar Distile su, Distile su+Cu (Çizelge 4.7), SDB, SDB+Cu (Çizelge 4.8), MEB ve MEB+Cu (Çizelge 4.9) ortamlarında optimum koşullarda 120 saat boyunca inkübe edilerek 24 saatte bir enzim aktivitesi tespit edildi.

**Çizelge 4.7.** Tekrarlı kesikli süreçte Distile su ve Distile su+Cu ortamında *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL)

İnkübasyon Zamanı (Saat)	<i>F. trogii</i>		<i>T. versicolor</i>	
	0.68g/50mL Distile su	0.68g/50mL Distile su+Cu	0.70g/50mL Distile su	0.70g/50mL Distile su+Cu
24.	0.19±0.01	0.34±0.01	0.13±0.01	0.32±0.01
48.	0.20±0.01	0.41±0.02	0.17±0.01	0.71±0.03
72.	0.24±0.01	3.76±0.13	0.20±0.01	2.21±0.16
96.	0.27±0.01	4.04±0.16	0.22±0.01	2.42±0.16
120.	0.25±0.02	3.23±0.20	0.18±0.03	2.11±0.10

Distile su ve Distile su+Cu ortamında herhangi bir karbon ve azot kaynağı bulunmamasına rağmen, hem *F. trogii* hem de *T. versicolor*' un lakkaz ürettiği saptandı. Bu durum her iki fungusun da test ortamlarına (Distile su ve Distile su+Cu) aktarılmadan önce üretildiği SDB ortamından bir miktar karbon ve azot kaynağının alarak depo edebileceğini göstermektedir. Distile su ve Distile su+Cu ortamlarında inkübe edilen fungusların ürettiği en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 96. saatinde gerçekleşmiş olup, indükleyici madde olarak 0.5 mM bakır ilave edilmiş ortamda enzim aktivitelerinin daha yüksek olduğu tespit edildi.

Tekrarlı kesikli süreçte Distile su+Cu ortamında inkübe edilen *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin 5 günlük inkübasyonu sonucunda toplam lakkaz aktivitesi sırasıyla 12 ve 08 U/mL olarak saptandı.

**Çizelge 4.8.** Tekrarlı kesikli süreçte SDB ve SDB+Cu ortamında *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL)

İnkübasyon Zamanı (Saat)	<i>F. trogii</i>		<i>T. versicolor</i>	
	0.68g/50mL SDB	0.68g/50mL SDB+Cu	0.70g/50mL SDB	0.70g/50mL SDB+Cu
24.	0.42±0.03	4.86±0.28	0.29±0.02	2.25±0.15
48.	0.52±0.02	5.72±0.38	0.32±0.01	3.09±0.18
72.	0.63±0.03	7.98±0.40	0.34±0.03	3.41±0.21
96.	0.65±0.02	9.36±0.56	0.37±0.04	3.62±0.07
120.	0.67±0.03	15.02±0.82	0.39±0.02	4.26±0.23

SDB ve SDB+Cu ortamlarının fungal gelişim ve enzim üretimi için gerekli besinsel kaynakları içerdiği düşünüldüğünde bu ortamlarda inkübe edilen her iki fungusun da Distile su ve Distile su+Cu ortamlarında ürettikleri lakkaz miktarlarının yüksek olması tahmin edilebilecek bir sonuçtur. Besin faktörleri fungus peletlerinin ömür uzunluğunu da artırmaktadır. SDB ve SDB+Cu ortamlarında inkübe edilen her iki fungusun da en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 120. saatinde belirlenmiş olup, indükleyici madde olarak 0.5 mM bakır ilave edilmiş ortamda enzim aktivitelerinin daha yüksek olduğu saptandı.

Tekrarlı kesikli süreçte SDB+Cu ortamında inkübe edilen *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin 5 günlük inkübasyonu sonucunda toplam lakkaz aktivitesi sırasıyla 43 ve 17 U/mL olarak saptandı.

**Çizelge 4.9.** Tekrarlı kesikli süreçte MEB ve MEB+Cu ortamında *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL)

İnkübasyon Zamanı (Saat)	<i>F. trogii</i>		<i>T. versicolor</i>	
	0.68g/50mL MEB	0.68g/50mL MEB+Cu	0.70g/50mL MEB	0.70g/50mL MEB+Cu
24.	0.79±0.08	5.77±0.41	0.53±0.09	4.38±0.27
48.	1.22±0.07	10.83±0.62	1.09±0.07	4.58±0.29
72.	1.64±0.16	13.83±0.54	1.28±0.14	5.58±0.46
96.	1.47±0.14	17.68±0.97	0.88±0.04	6.27±0.30
120.	1.22±0.12	11.12±1.22	0.78±0.05	3.52±0.25

MEB ve MEB+Cu ortamlarında inkübe edilen funguslar hem Distile su ve Distile su+Cu hem de SDB ve SDB+Cu ortamlarında üretilenden daha yüksek lakkaz ürettiği saptandı. MEB ve MEB+Cu ortamlarında inkübe edilen her iki fungusun da ürettiği en yüksek enzim aktivitesi inkübasyonun 96. saatinde gerçekleşmiş olup, indükleyici madde olarak 0.5 mM bakır ilave edilmiş ortamda lakkaz aktivitelerinin daha yüksek olduğu tespit edildi (Çizelge 4.9.).

Tekrarlı kesikli süreçte MEB+Cu ortamında inkübe edilen *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin 5 günlük inkübasyonu sonucunda toplam lakkaz aktivitesi sırasıyla 59 ve 24 U/mL olarak saptandı.

Arora ve Gill (2000) tarafından yapılan bir çalışmada MSB (Mineral Tuz Ortamı), MEB ve MSB-MEB ortamlarının *T. versicolor*, *D. squalens*, *P. fascicularia* ve *P. floridensis*' in lakkaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. *D. squalens*, *P. fascicularia* ve *P. floridensis*' in en yüksek lakkaz aktivitesinin MEB ortamında sırasıyla 0.020, 4.955, 2.650 cU/mL, *P. fascicularia*' nın en yüksek lakkaz aktivitesinin ise MSB-MEB ortamında 4.930 cU/mL olduğu ifade edilmektedir [42].

Kahraman ve Yeşilada (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, iki tip atık su (alkol fabrikası atık suyu, zeytinyağı fabrikası atık suyu) ve bir lignoselülozik atık (pamuk sapı) *Funalia trogii* ve *Coriolus versicolor* için kültür ortamı olarak kullanılmıştır. Funguslar pamuk saplarının eklendiği ya da eklenmediği doğal ortamlarda (vinas ve zeytinyağı atık suyu) yüksek oranlarda lakkaz üretmiştir [53].

#### 4.5. İndükleyici Maddelerin STO ve STO+Cu Ortamlarında *F. trogii* ve *T. versicolor* Peletlerinin Lakkaz Üretimine Etkisi

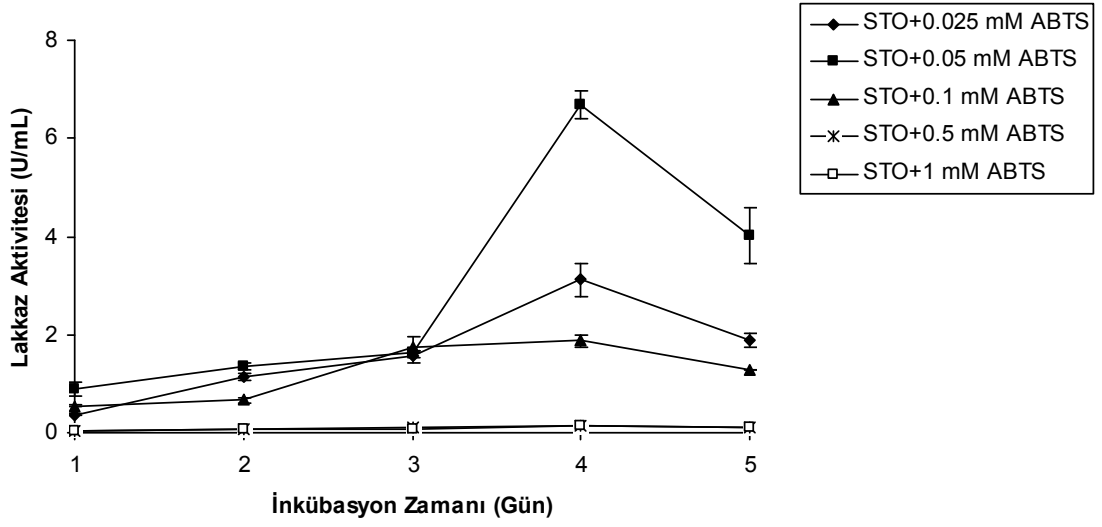
##### 4.5.1. ABTS eklenmiş STO ve STO+Cu ortamlarında *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri ile lakkaz üretimi

Besiyerlerine ilave edilen ek maddelerin pek çok beyaz çürükçül fungusun lakkaz aktivitesi üzerine olumlu veya olumsuz etkileri bildirilmiştir. Bu amaçla, *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin inkübe edildiği STO ve STO+Cu ortamına çeşitli konsantrasyonlarda (0.025, 0.05, 0.1, 0.5 ve 1 mM) ABTS ilave edildi. Her iki fungus peletleri üzerine STO+Cu+ABTS ortamlarının ilavesinden kısa bir süre sonra kültür ortamlarının sarıdan yeşile dönüştüğü gözlemlendi (Şekil 4.27).

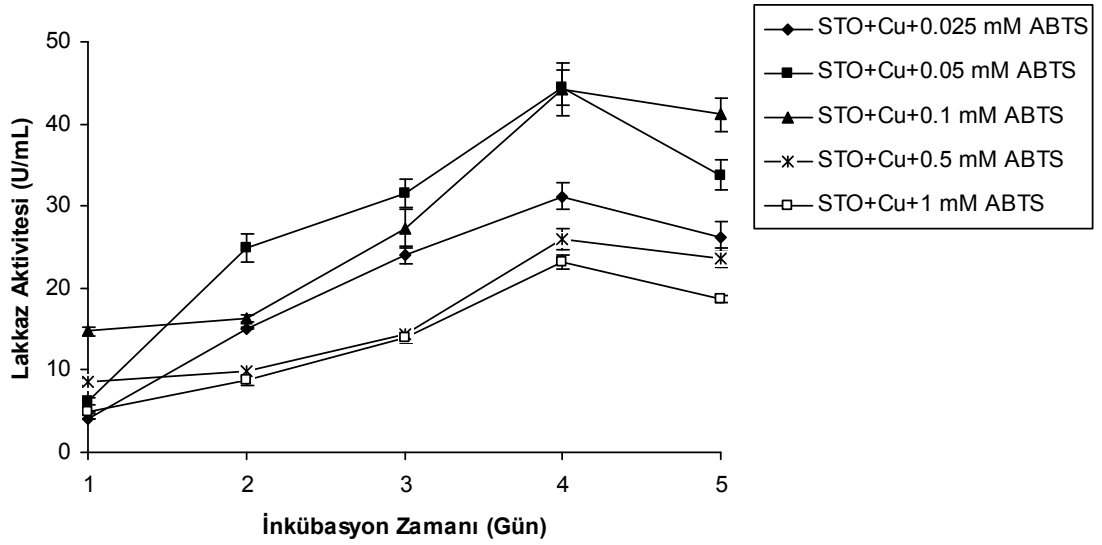


**Şekil 4.27.** *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin STO+Cu+ABTS ortamlarının ilavesinden kısa bir süre sonraki görünümü

Yapılan çalışmalar sonucunda *F. trogii* ve *T. versicolor*' un en yüksek enzim aktivitesi inkübasyonun 4. gününde 0.05 mM ABTS ilave edilmiş STO ortamlarında sırasıyla 6.70 ve 4.76 U/mL olarak belirlenirken (Şekil 4.28, 4.30), STO+Cu ortamlarında ise sırasıyla 44.43 ve 26.49 U/mL olarak saptandı (Şekil 4.29, 4.31).

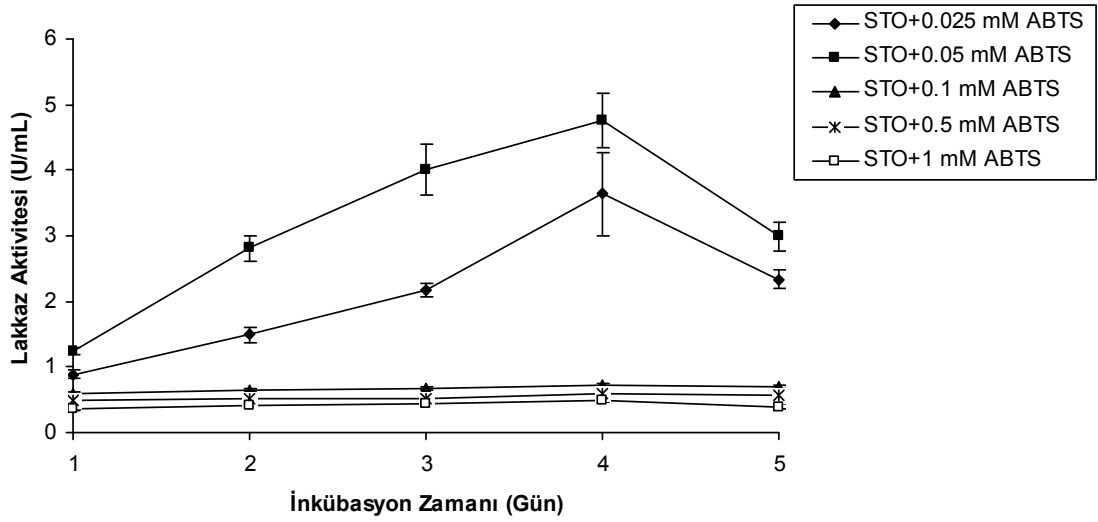


Şekil 4.28. ABTS içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)

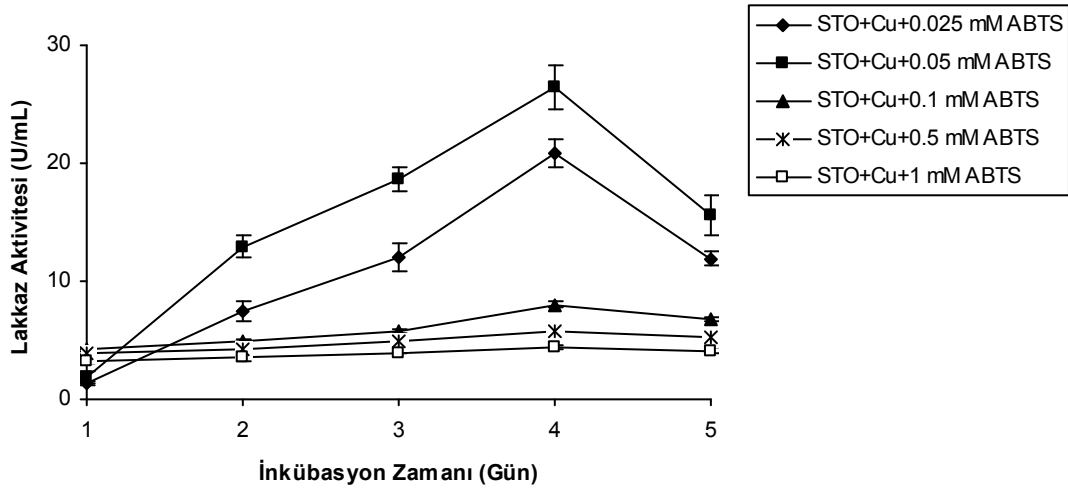


Şekil 4.29. ABTS içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)





**Şekil 4.30.** ABTS içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)



**Şekil 4.31.** ABTS içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)

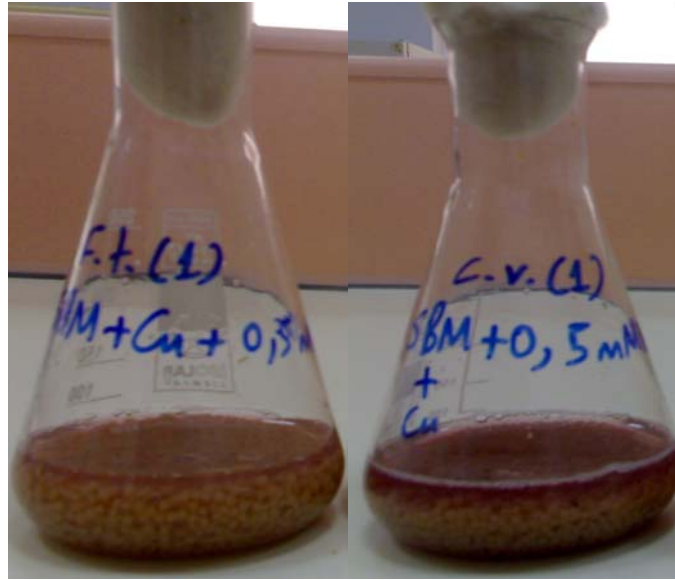
Tekrarlı kesikli süreçte STO+Cu+0.05 mM ABTS ortamında inkübe edilen *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin 5 günlük inkübasyonu sonucunda toplam lakkaz aktivitesi sırasıyla 141 ve 75 U/mL olarak saptandı.

Yapılan bir çalışmada *Pleurotus ostreatus* 32 soyunun üreme ortamına inkübasyondan 4 gün sonra 1 mM konsantrasyonda bakır ilave edilmiş ve fungus 28 °C’ de statik koşullarda üretime alınmıştır. İnkübasyonun 18. gününde yapılan enzim aktivitesi ölçümü sonrasında bakır ilave edilmiş kültür ortamındaki enzim aktivitesinin kontrole kıyasla yaklaşık 4.5 katı olan 360 U/mL olduğu saptanmıştır. En yüksek lakkaz aktivitesi ABTS ilave edilmiş ortamda yaklaşık 410 U/mL olup, bu değer kontrolün yaklaşık 5 katı olarak ifade edilmektedir [151].

Bazı durumlarda kullanılan indükleyici madde veya madde konsantrasyonu organizma üzerine olumsuz etki göstererek enzim aktivitesinin düşüşüne neden olabilmektedir. Örneğin, Osma vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada *Trametes pubescens*’ in üreme ortamına 1 mM ABTS ilave edilmiş ve lakkaz üretimindeki değişim gözlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda ortama ilave edilen ABTS’ nin, fungus üzerine olumsuz etki gösterdiği ve fungusun ABTS içeren ortamda kontrol gruplarına kıyasla daha düşük oranda lakkaz ürettiği tespit edilmiştir [178].

#### 4.5.2. Şiringaldazin eklenmiş STO ve STO+Cu ortamlarında *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri ile lakkaz üretimi

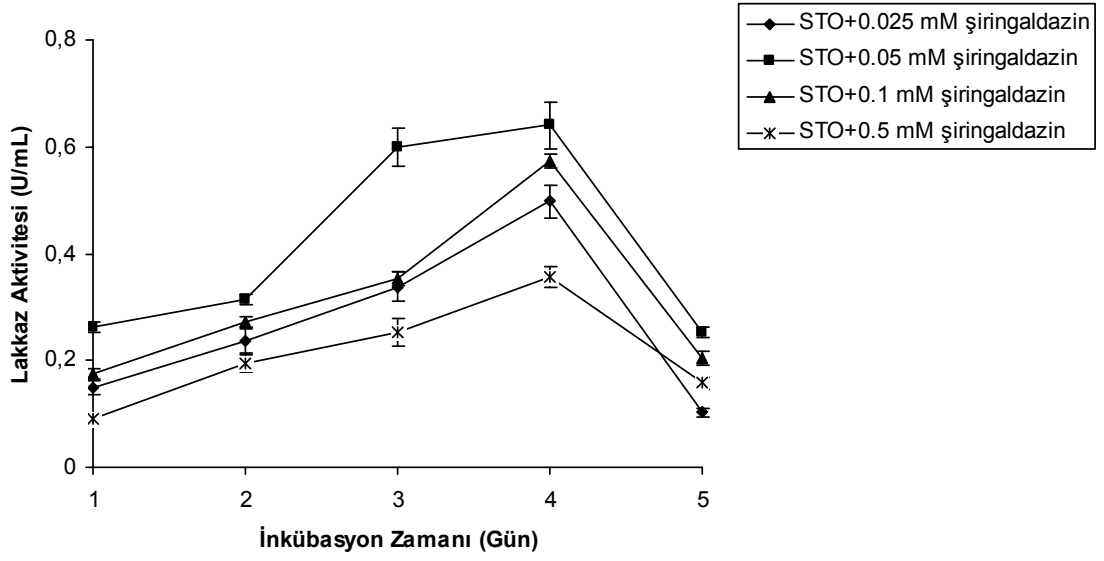
Lakkaz aktivitesinin ölçümünde kullanılan şiringaldazin bazı araştırmacılar tarafından indükleyici olarak da kullanılmaktadır. *F. trogii* ve *T. versicolor*' un inkübe edildiği STO ve STO+Cu ortamlarına çeşitli konsantrasyonlarda şiringaldazin ilave edilerek funguslar optimum koşullarda 5 gün boyunca tekrarlı kesikli süreçte inkübe edildi. *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri üzerine STO+Cu+şiringaldazin ortamlarının ilavesinden kısa bir süre sonra kültür ortamlarının sarıdan pembeye dönüştüğü gözlemlendi (Şekil 4.32).



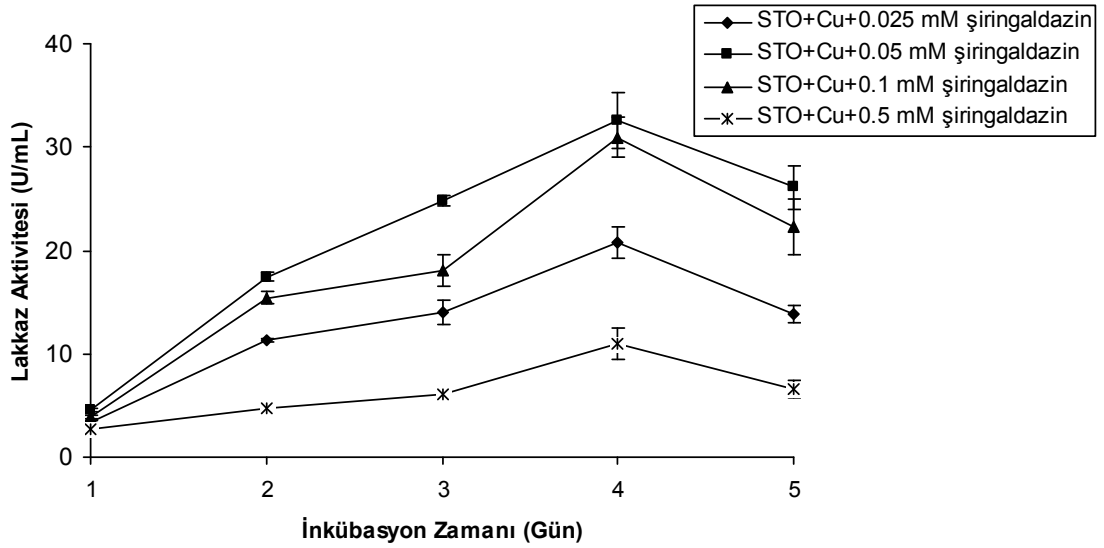
**Şekil 4.32.** *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin STO+Cu+şiringaldazin ortamlarının ilavesinden kısa bir süre sonraki görünümü

Yapılan enzim ölçümleri sonucunda *F. trogii*' nin en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 4. gününde 0.05 mM şiringaldazin eklenmiş STO ve STO+Cu ortamlarında sırasıyla 0.64 ve 32.52 U/mL olarak tespit edildi (Şekil 4.33, 4.34).

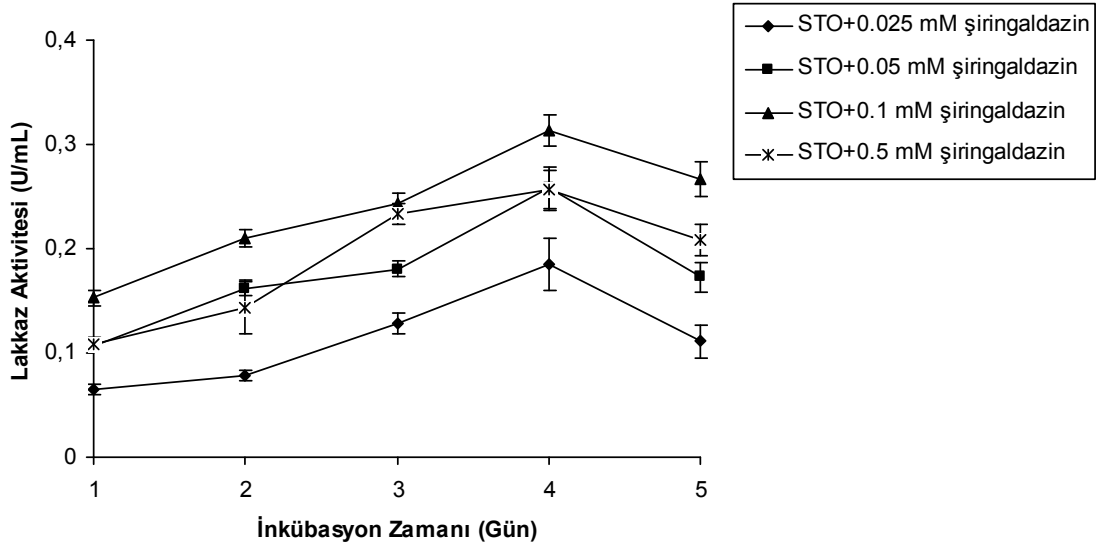
*T. versicolor*' un en yüksek lakkaz aktivitesi ise 0.1 mM şiringaldazin eklenmiş STO ve STO+Cu ortamlarında sırasıyla 0.31 ve 22.23 U/mL olarak belirlendi (Şekil 4.35, 4.36).



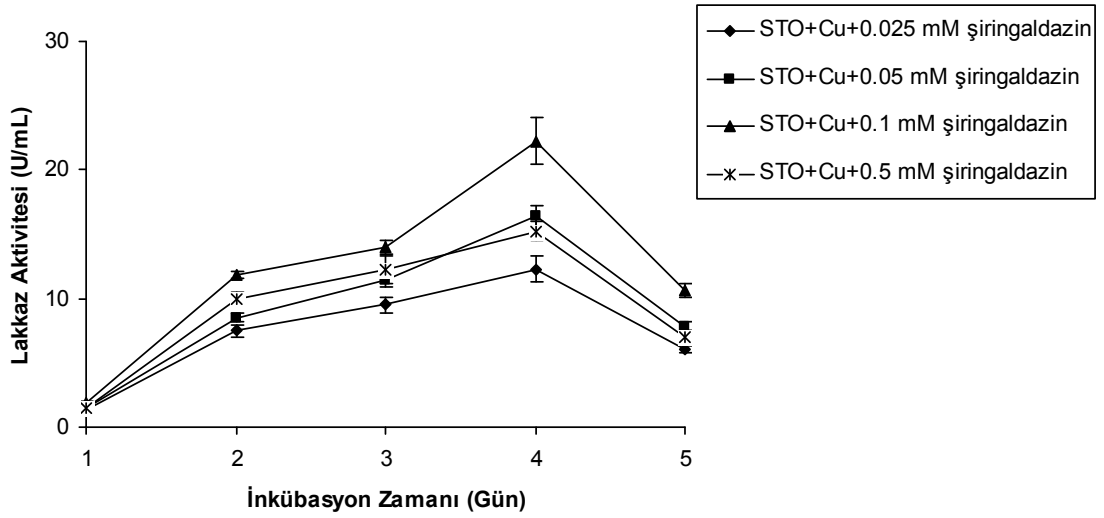
Şekil 4.33. Şiringaldazin içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *F. trogl*i peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)



Şekil 4.34. Şiringaldazin içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *F. trogl*i peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)



Şekil 4.35. Şiringaldazin içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)



Şekil 4.36. Şiringaldazin içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)

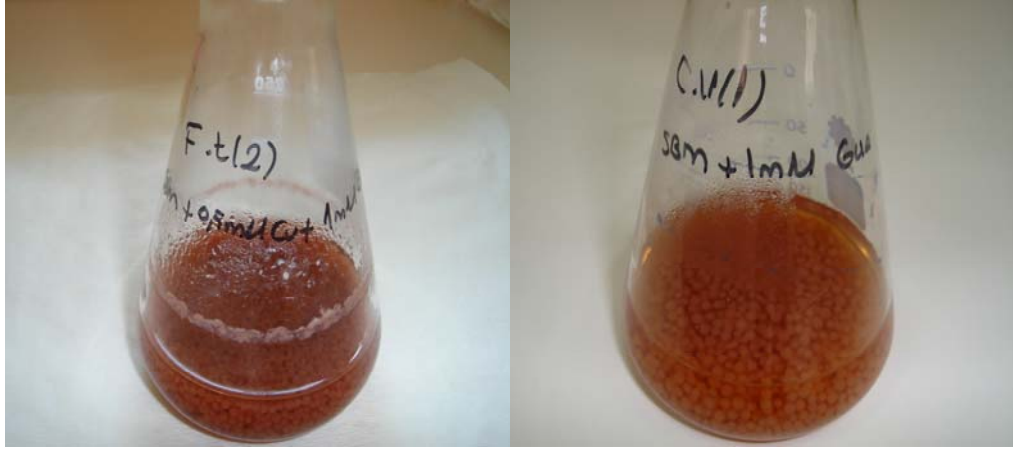
Tekrarlı kesikli süreçte *F. trogii*' nin STO+Cu+0.05 mM şiringaldazin ortamında 5 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen toplam lakkaz aktivitesi 105 U/mL iken, *T. versicolor*' un STO+Cu+0.1 mM şiringaldazin ortamında 5 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen toplam lakkaz aktivitesi 61 U/mL olarak saptandı.

*Coriolus hirsutus* kullanılarak yapılan bir çalışmada besiyeri ortamına çeşitli indükleyici maddeler ilave edilmiş ve bu maddeler içerisinde en etkili indükleyicinin şiringaldazin olduğu ifade edilmiştir. Fungusun 0.11 µM şiringaldazin ilave edilmiş ortamda en yüksek lakkaz aktivite değerinin 50 U/mL olduğu rapor edilmiştir [179].

Rosales vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada *Trametes hirsuta*' nin katı substrat ortamına indükleyici madde olarak farklı konsantrasyonlarda CuSO<sub>4</sub> ve şiringaldazin eklenmiştir. Ortamlardan birincisine 1 mM bakır, diğerine ise 0.11 µM şiringaldazin ilave edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda en yüksek lakkaz aktivitesi kontrol ortamında yaklaşık 4000 U/L iken, bakır ilave edilmiş ortamda yaklaşık 20000 U/L, şiringaldazin ilave edilmiş ortamda ise 6000 U/L olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada kültür ortamına bu defa 1 mM bakır+0.11 µM şiringaldazin ilave edilmiş ve en yüksek enzim aktivitesinin yaklaşık 21000 U/L olduğu saptanmıştır [146].

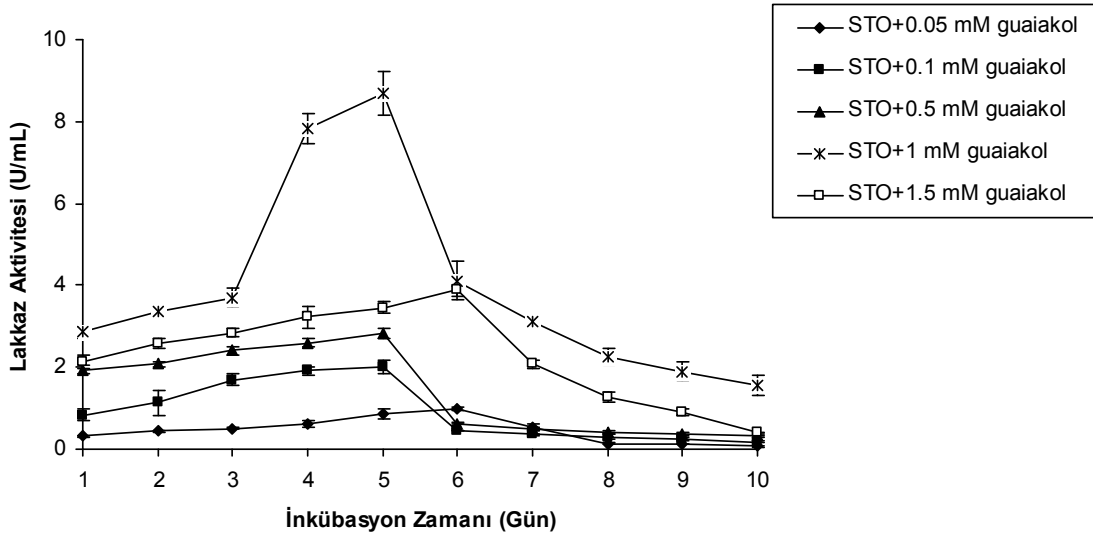
#### **4.5.3. Guaiakol eklenmiş STO ve STO+Cu ortamlarında *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri ile lakkaz üretimi**

Aromatik bir indükleyici olan guaiakol de pek çok enzimatik çalışmada lakkaz üretiminin artırılmasında kullanılmaktadır. *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin inkübe edildiği STO ve STO+Cu ortamlarına farklı konsantrasyonlarda guaiakol ilave edilerek funguslar optimum koşullarda 10 gün boyunca inkübe edildi. Hem *F. trogii* hem de *T. versicolor* peletleri üzerine STO+Cu+guaiakol ortamlarının ilavesinden kısa bir süre sonra kültür ortamlarının sarıdan açık kahverengiye dönüştüğü gözlemlendi (Şekil 4.37).

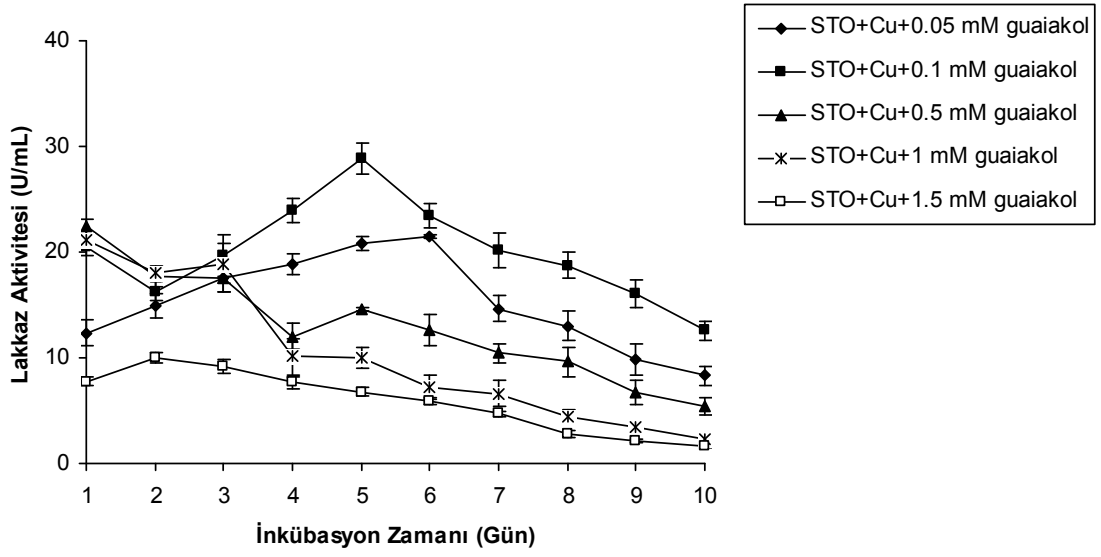


**Şekil 4.37.** *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin STO+Cu+guaiakol ortamlarının ilavesinden kısa bir süre sonraki görünümü

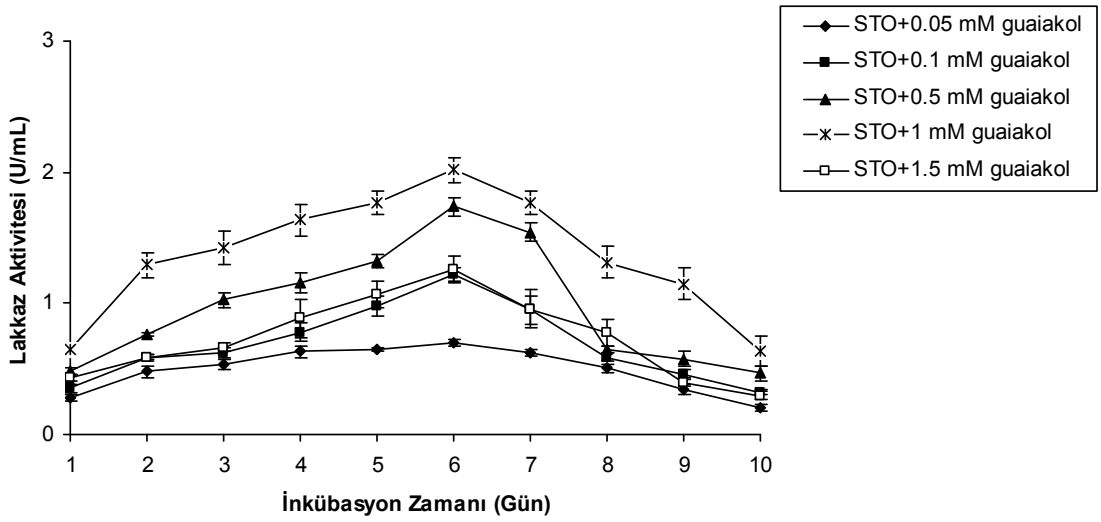
Yapılan ölçümler sonucunda *F. trogii*'nin en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 5. gününde 1 mM guaiakol eklenmiş STO ortamında 8.70 U/mL iken, STO+Cu ortamında ise 28.84 U/mL olarak tespit edildi (Şekil 4.38, 4.39). *T. versicolor*'un en yüksek lakkaz aktivitesi ise 1 mM guaiakol eklenmiş STO ve STO+Cu ortamlarında sırasıyla 2.02 ve 5.71 U/mL olarak belirlendi (Şekil 4.40, 4.41).



**Şekil 4.38.** Guaiakol içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)

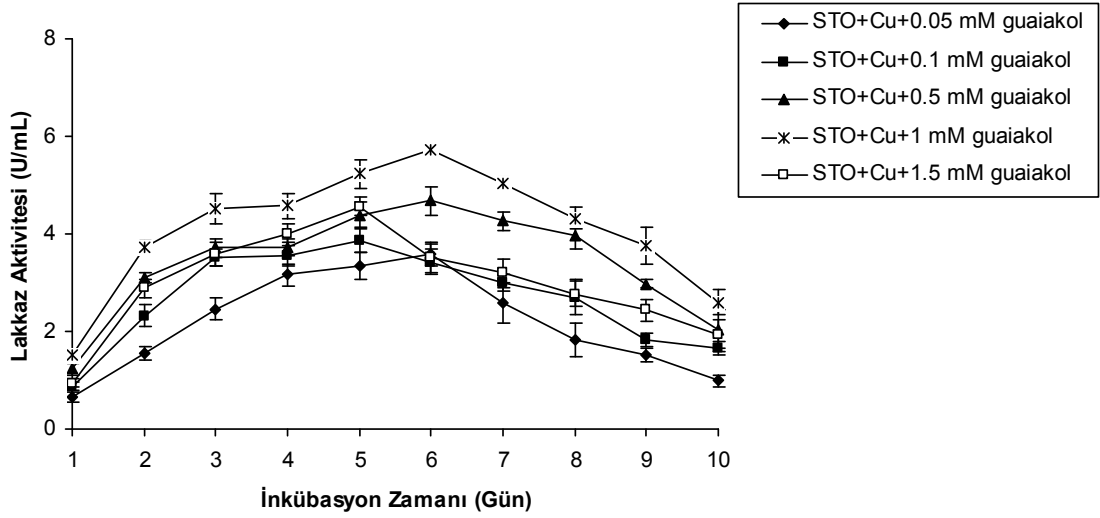


Şekil 4.39. Guaiakol içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)



Şekil 4.40. Guaiakol içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)





**Şekil 4.41.** Guaiakol içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)

Tekrarlı kesikli süreçte *F. trogii*' nin STO+Cu+0.1 mM guaiakol ortamında 10 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen toplam lakkaz aktivitesi 200 U/mL iken, *T. versicolor*' un STO+Cu+1 mM guaiakol ortamında 10 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen toplam lakkaz aktivitesi 41 U/mL olarak saptandı.

*Trametes versicolor*' un kullanıldığı bir çalışmada 20 g/L etanol içeren kültür ortamına 1 mM guaiakol ilave edilmiş ve en yüksek lakkaz aktivitesi 3 U/mL olarak saptanmıştır [180].

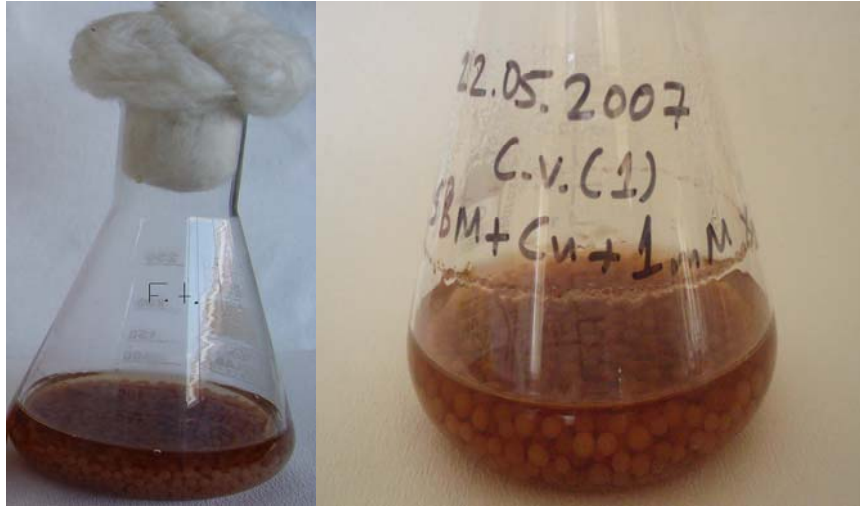
*Trametes pubescens* MB 89 soyunun kültür ortamına üretimin 4. gününde çeşitli indükleyiciler 1 mM konsantrasyonda ilave edilmiş ve enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bu indükleyicilerden guaiakol eklenmiş ortamdaki lakkaz aktivitesi 4.4 U/mL olup, bu değer kontrol ortamındaki enzim aktivitesinin 2 katından daha fazla olduğu belirtilmiştir [152].

D' Souza vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada bir deniz fungal izolatu olan NIOCC#2a' nın kültür ortamı olan B&K ortamına 1 mM guaiakol ve 2 mM bakır sülfat ile birlikte 1 mM guaiakol ilave edilmiş fungus 21 gün boyunca inkübe edilerek her 3 günde bir lakkaz aktivitesi ölçülmüştür. Yapılan enzim ölçümü sonucunda en yüksek aktivite kontrol grubunda inkübasyonun 18. gününde 921 U/L, 1 mM guaiakol ilave edilmiş ortamda inkübasyonun 21. gününde 21112 U/L, 2 mM bakır sülfat ile birlikte 1 mM guaiakol eklenmiş ortamda ise inkübasyonun 21. gününde 46781 U/L olarak ifade edilmiştir [35].

Guaiakol ilavesiyle *P. florida* ve *P. cinnabarinus*' da lakkaz üretiminin baskılanmasına rağmen [101, 111], *Stereum hirsutum* ve *Marasmius graminium*' da [102] guaiakolün indükleyici etkisi rapor edilmiştir. Guaiakol' ün funguslardaki baskılayıcı etkisi bu çalışmalarda kullanılan guaiakolün yüksek konsantrasyonlarda olmasından kaynaklanabilir [72].

#### 4.5.4. 2,5-ksilidin (2,5-dimetilanilin) eklenmiş STO ve STO+Cu ortamlarında *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri ile lakkaz üretimi

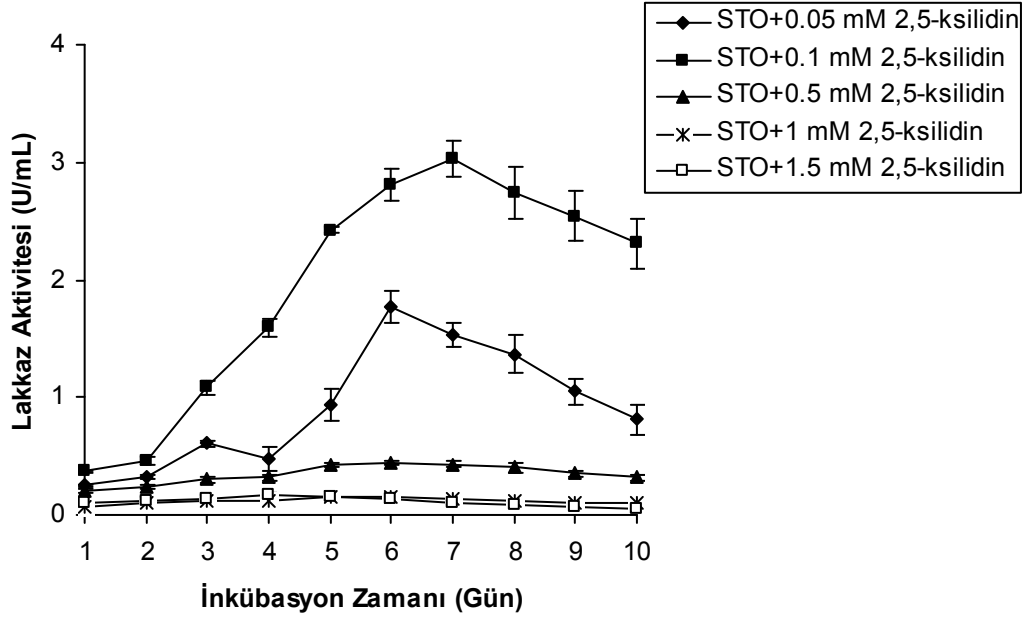
Guaiakol gibi aromatik yapıda olan diğer bir lakkaz indükleyicisi 2,5-ksilidin olup, lakkaz üretiminin artırılmasına yönelik pek çok çalışmada kullanılmaktadır. Buna göre, *F. trogii* ve *T. versicolor*' un inkübe edildiği STO ve STO+Cu ortamlarına farklı konsantrasyonlarda 2,5-ksilidin ilave edilerek funguslar optimum koşullarda 10 gün boyunca inkübe edildi. Hem *F. trogii* hem de *T. versicolor* peletleri üzerine STO+Cu+2,5-ksilidin ortamlarının ilavesinden kısa bir süre sonra kültür ortamlarının sarıdan kahverengiye dönüştüğü gözlemlendi (Şekil 4.42).



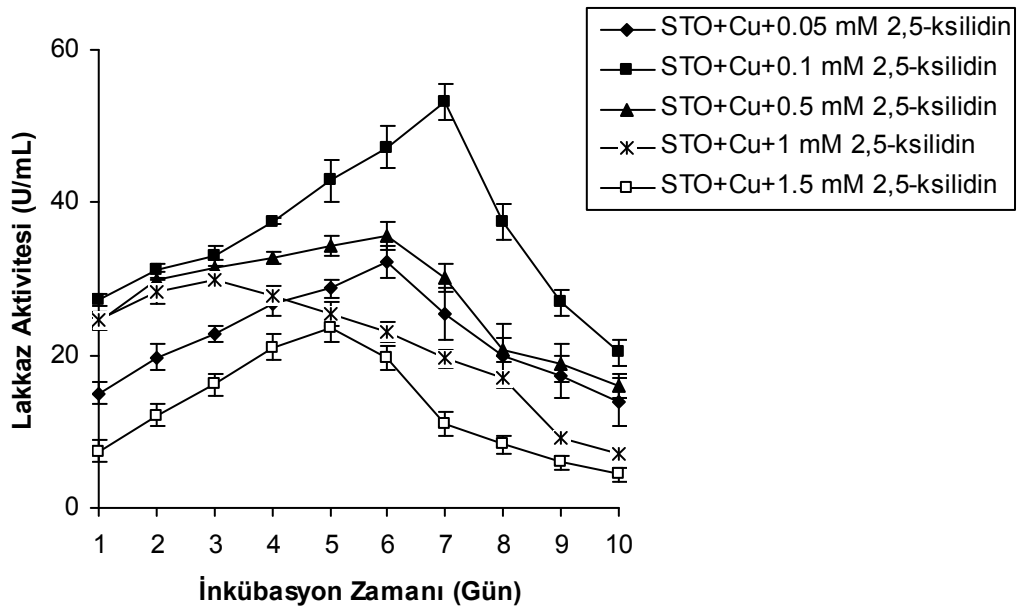
**Şekil 4.42.** *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin STO+Cu+2,5-ksilidin ortamlarının ilavesinden kısa bir süre sonraki görünümü

Yapılan ölçümler sonucunda *F. trogii*' nin en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 7. gününde 0.1 mM 2,5-ksilidin eklenmiş STO ortamında 3.03 U/mL iken, STO+Cu ortamında ise 53.26 U/mL olarak tespit edildi (Şekil 4.43, 4.44).

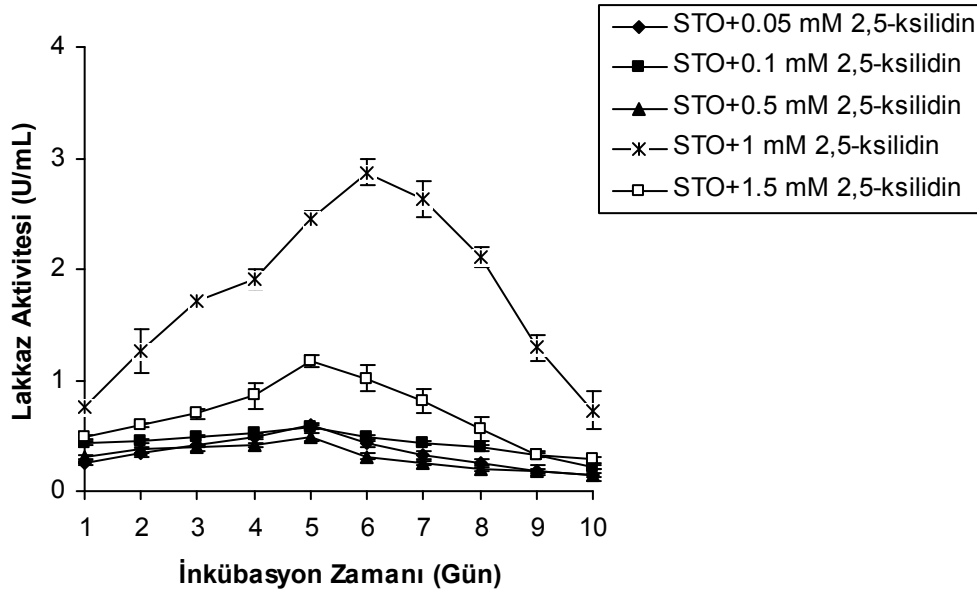
*T. versicolor*' un en yüksek lakkaz aktivitesi ise inkübasyonun 7. gününde 1 mM 2,5-ksilidin eklenmiş STO ortamında 2.87 U/mL iken, STO+Cu ortamında 33.61 U/mL olarak belirlendi (Şekil 4.45, 4.46).



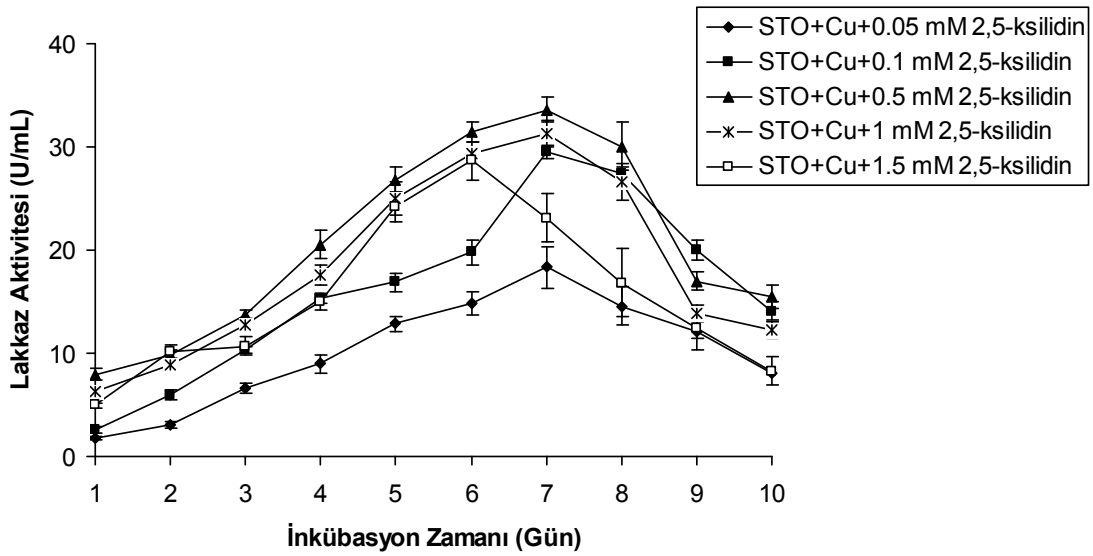
Şekil 4.43. 2,5-ksilidin içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)



Şekil 4.44. 2,5-ksilidin içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)



Şekil 4.45. 2,5-ksilidin içeren STO ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi (U/mL)



Şekil 4.46. 2,5-ksilidin içeren STO+Cu ortamında tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilen *T. versicolor* peletleri ile lakkaz üretimi (U/mL)

Tekrarlı kesikli süreçte *F. trogii*' nin STO+Cu+0.1 mM 2,5-ksilidin ortamında 10 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen toplam lakkaz aktivitesi 357 U/mL iken, *T. versicolor*' un STO+Cu+0.5 mM 2,5-ksilidin ortamında 10 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen toplam lakkaz aktivitesi 206 U/mL olarak saptandı.

Jung vd. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada *Trichophyton rubrum* LKY-7 soyunun glukoz-pepton sıvı ortamına 2.5, 5.0, 10.0 µM konsantrasyonlarda 2,5-ksilidin ilave edilmiş ve 5.0 ve 10.0 µM konsantrasyonlarda ilave edilen ksilidinin fungus üzerine toksik etki göstermesinden dolayı bu ortamlarda lakkaz üretiminin inhibe olduğu, en yüksek enzim aktivitesinin ise 2.5 µM 2,5-ksilidin ilave edilmiş ortamda elde edildiği rapor edilmiştir [181].

*Trametes versicolor*' un üreme ortamına 1 mM 2,5-ksilidin ile farklı konsantrasyonlarda CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ilave edilmesi lakkaz aktivitesini indüklemekte olduğu, en yüksek enzim aktivitesinin ise 20. günde 2,5-ksilidin ile beraber 0.4 mM CuSO<sub>4</sub> ilave edilmiş kültürlerde 12756 U/L olduğu rapor edilmiştir [147].

Couto vd. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada *T. versicolor* ve *T. hirsuta*' nın katı kültür ortamına 0.5, 1 ve 2 mM konsantrasyonlarda 2,5-ksilidin ilave edilmiş, *T. versicolor* için en yüksek lakkaz aktivitesi 2 mM 2,5-ksilidin ilave edilen ortamda yaklaşık 36000 U/L iken, *T. hirsuta* için en yüksek lakkaz aktivitesi 1 mM 2,5-ksilidin ilave edilen ortamda yaklaşık 47000 U/L olarak belirlenmiştir [149].

Revankar ve Lele (2006) tarafından yapılan çalışmada bir beyaz çürükçül fungus soyu olan *WR-1*' in optimize edilmiş kültür ortamına inkübasyonun 4. gününde farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.8, 1, 2, 3, 4 mM) 2,5-ksilidin ilave edilmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi 0.8 mM 2,5-ksilidin ilave edilmiş ortamda 6. günde 692 U/mL olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada fungusun kültür ortamına 0.8 mM 2,5-ksilidin ile birlikte 1 mM bakır sülfat ilave edildiğinde en yüksek enzim aktivitesinin inkübasyonun 6. gününde 410 U/mL olduğu rapor edilmiştir. Üreme ortamına indükleyici madde ilavesinden sonra fungus 28 °C' de 150 rpm çalkalama hızında inkübe edilerek bu indükleyicilerin lakkaz aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda kontrol gruplarında en yüksek lakkaz aktivitesi inkübasyonun 7. gününde 280 U/mL iken, indükleyici ilave edilmiş ortamlarda en yüksek enzim aktivitesi inkübasyonun 6. gününde saptanmıştır. Lakkaz aktivitesini artıran en etkili indükleyiciler sırasıyla 2,5-ksilidin (614 U/mL), *p*-anisidin (472 U/mL), gallik asit (447 U/mL) ve ferulik asit (433 U/mL) olarak belirlenmiştir. En

etkili indükleyici olarak saptanan 2,5-ksilidin konsantrasyonu 1 mM' dan 0.8 mM' a düşürüldüğünde enzim aktivitesinin 614 U/mL' den 692 U/mL' ye çıktığı ifade edilmektedir [32].

#### 4.6. *F. trogii* ve *T. versicolor*' un İnkübasyonun 1. ve 5. Günlerinde Kültür Sıvısındaki Bakır Miktarının Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi İle Tespit Edilmesi

STO ve STO+0.5 mM Cu ortamında 5 gün boyunca inkübe edilen *F. trogii* ve *T. versicolor*' un inkübasyonun 1. ve 5. günlerinde kültür sıvısındaki bakır miktarının tespiti amacıyla kültür filtratları kullanılmıştır. Elde edilen filtratlardaki bakır miktarı ve stok kültür ortamlarındaki bakır miktarı atomik absorbsiyon spektrofotometresinden yararlanarak saptanmıştır. Buna göre *F. trogii*' nin STO+Cu ortamında 1 günlük inkübasyonundan sonra kültür sıvısında %53, 5 günlük inkübasyonun sonucunda ise %61 oranında bakır bulunduğu saptanmıştır. *T. versicolor*' un ise STO+Cu ortamında 1 günlük inkübasyonundan sonra kültür sıvısında %26, beş günlük inkübasyonun sonucunda ise %65 oranında bakır bulunduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar ışığında STO+Cu ortamında 1 gün inkübe edilen *T. versicolor*' un kültür ortamından absorbe ettiği bakır miktarı *F. trogii*' nin absorbe ettiği bakır miktarının yaklaşık 1.5 katıdır. Ancak inkübasyonun ilerleyen günlerinde STO+Cu ortamında 5 gün inkübe edilen *T. versicolor*' un kültür ortamından absorbe ettiği bakır miktarı *F. trogii*' nin absorbe ettiği bakır miktarından daha düşük olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.10.).

**Çizelge 4.10.** Stok STO ve STO+Cu çözeltisi ile *F. trogii* ve *T. versicolor* kültür sıvılarında analiz edilen bakır oranı

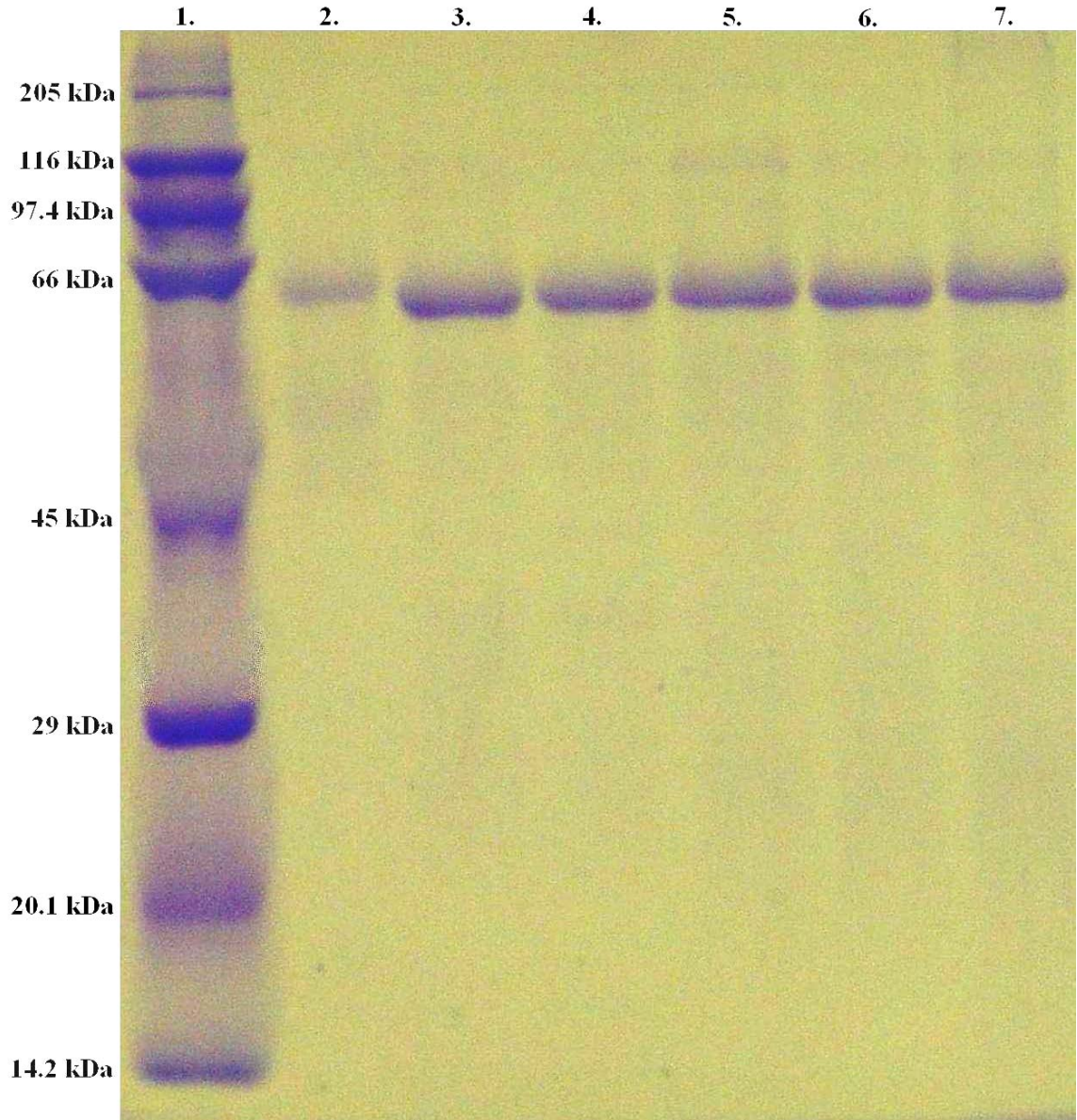
İnkübasyon Zamanı (Gün)	Stok STO Çözeltisi 0.00 mg/50mL (% 0)		Stok STO+Cu Çözeltisi 1.53 mg/50mL (% 100)	
	<i>F. trogii</i> kültür sıvısı		<i>T. versicolor</i> kültür sıvısı	
	STO	STO+Cu	STO	STO+Cu
1.	0.00 mg/50mL (% 0)	0.82 mg/50mL (% 53)	0.00 mg/50mL (% 0)	0.39 mg/50mL (% 26)
5.	0.00 mg/50mL (% 0)	0.93 mg/50mL (% 61)	0.00 mg/50mL (% 0)	1.00 mg/50mL (% 65)

#### **4.7. *F. trogii* ve *T. versicolor* Lakkaz Enzimlerinin Spesifik Aktiviteleri**

*F. trogii* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte en yüksek miktarda enzim ürettiği STO+Cu, STO+Cu+ 0.05 mM şiringaldazin, STO+Cu+0.1 mM guaiakol, STO+Cu+0.1 mM 2,5-ksilidin ve STO+Cu+0.05 mM ABTS ortamlarından alınan kültür sıvılarındaki lakkazların spesifik aktiviteleri sırasıyla 192, 171, 152, 232 ve 202 U/mg protein olarak saptandı. *T. versicolor* peletlerinin ise tekrarlı kesikli süreçte en yüksek miktarda enzim ürettiği STO+Cu, STO+Cu+0.1 mM şiringaldazin, STO+Cu+1 mM guaiakol, STO+Cu+0.5 mM 2,5-ksilidin ve STO+Cu+0.05 mM ABTS ortamlarından alınan kültür sıvılarındaki lakkazların spesifik aktiviteleri de sırasıyla 122, 165, 82, 177 ve 162 U/mg protein olarak saptandı.

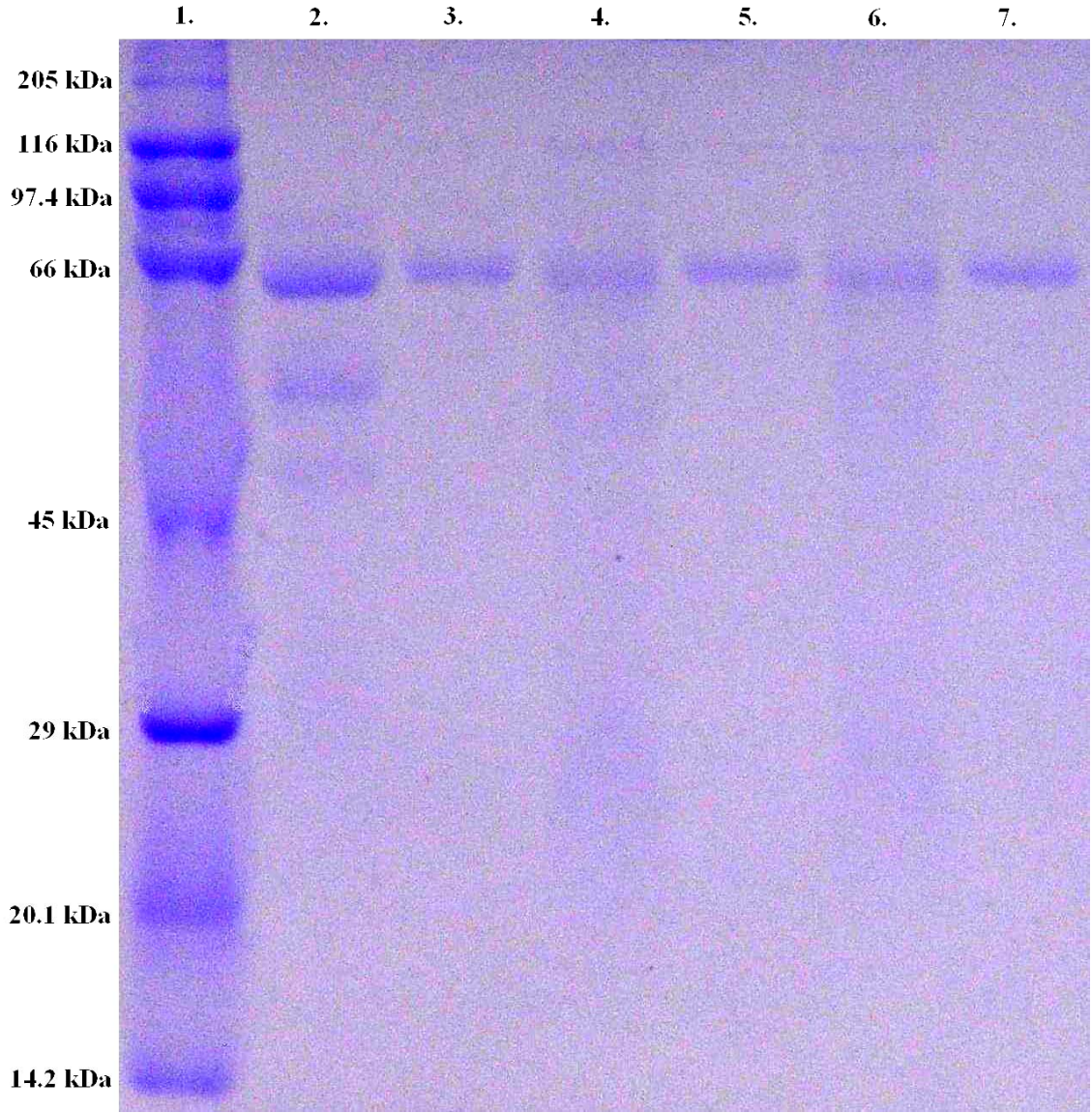
#### **4.8. *F. trogii* ve *T. versicolor* Lakkaz Enzimlerinin Moleküler Ağırlıkları**

STO+Cu ortamı ve aynı ortama çeşitli indükleyici maddeler ilave edilmiş ortamlarda inkübe edilen *F. trogii* ve *T. versicolor*' un yüksek oranlarda sentezlediği lakkaz enzimleri SDS PAGE' de yürütülerek enzimin jel üzerindeki görüntüleri ve moleküler ağırlıkları tespit edildi. Hem *F. trogii* hem de *T. versicolor*' un kültür ortamlarından elde edilen kültür filtratlarında tek bir lakkaz enziminin varlığı belirlenmiş olup, ortamlarda lakkaz izoenzimlerinin olmadığı tespit edildi. Yapılan çalışma sonucunda *F. trogii* tarafından sentezlenen lakkaz enziminin 63 kDa (Şekil 4.47), *T. versicolor* tarafından sentezlenen enzimin ise 65 kDa moleküler ağırlığında olduğu saptandı (Şekil 4.48).



**Şekil 4.47.** *F. troglia* ham kültür filtratlarındaki lakkaz enzimlerinin SDS PAGE' de görüntülenmesi (Coomassie boyama) **1.** Protein standartları [Miyozin (205 kDa),  $\beta$ -Galaktozidaz (116 kDa), Fosforilaz-B (97.4 kDa), Albumin (BSA) (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Karbonik anhidraz (29 kDa), Tripsin inhibitör (20.1 kDa),  $\alpha$ -Laktalbumin (14.2 kDa)], **2.** Ticari lakkaz, **3.** STO+0.5 mM Cu, **4.** STO+Cu+0.05 mM şiringaldazin, **5.** STO+Cu+0.1 mM 2,5-ksilidin, **6.** STO+Cu+0.1 mM guaiakol, **7.** STO+Cu+0.05 mM ABTS





**Şekil 4.48.** *T. versicolor* ham kültür filtratlarındaki lakkaz enzimlerinin SDS PAGE’ de görüntülenmesi (Coomassie boyama) **1.** Protein standartları [Miyozin (205 kDa),  $\beta$ -Galaktozidaz (116 kDa), Fosforilaz-B (97.4 kDa), Albumin (BSA) (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Karbonik anhidraz (29 kDa), Tripsin inhibitör (20.1 kDa),  $\alpha$ -Laktalbumin (14.2 kDa)], **2.** Ticari lakkaz, **3.** STO+0.5 mM Cu, **4.** STO+Cu+0.1 mM şiringaldazin, **5.** STO+Cu+0.5 mM 2,5-ksilidin, **6.** STO+Cu+1 mM guaiakol, **7.** STO+Cu+0.05 mM ABTS

Yapılan pek çok çalışmada farklı fungusların hatta aynı fungus türünün farklı soylarının ürettiği lakkaz enzimlerinin farklı moleküler ağırlığa sahip olduğu saptanmıştır. Saito vd. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada topraktan izole edilmiş ve Chaetomiaceae ailesinden bir fungustan izole edilen lakkaz enzimi SDS PAGE' de yürütülmüş ve enzimin jel üzerinde tek bant oluşturduğu, enzimin moleküler ağırlığının ise yaklaşık 73 kDa olduğu belirlenmiştir [182].

Zhang vd. (2006) tarafından *Panus rudis* kullanılarak yapılan çalışmada da fungusun kültür ortamından saflaştırılan lakkazın SDS PAGE' de tek bant halinde görüldüğü ve enzimin moleküler ağırlığının 58 kDa olduğu saptanmıştır [88].

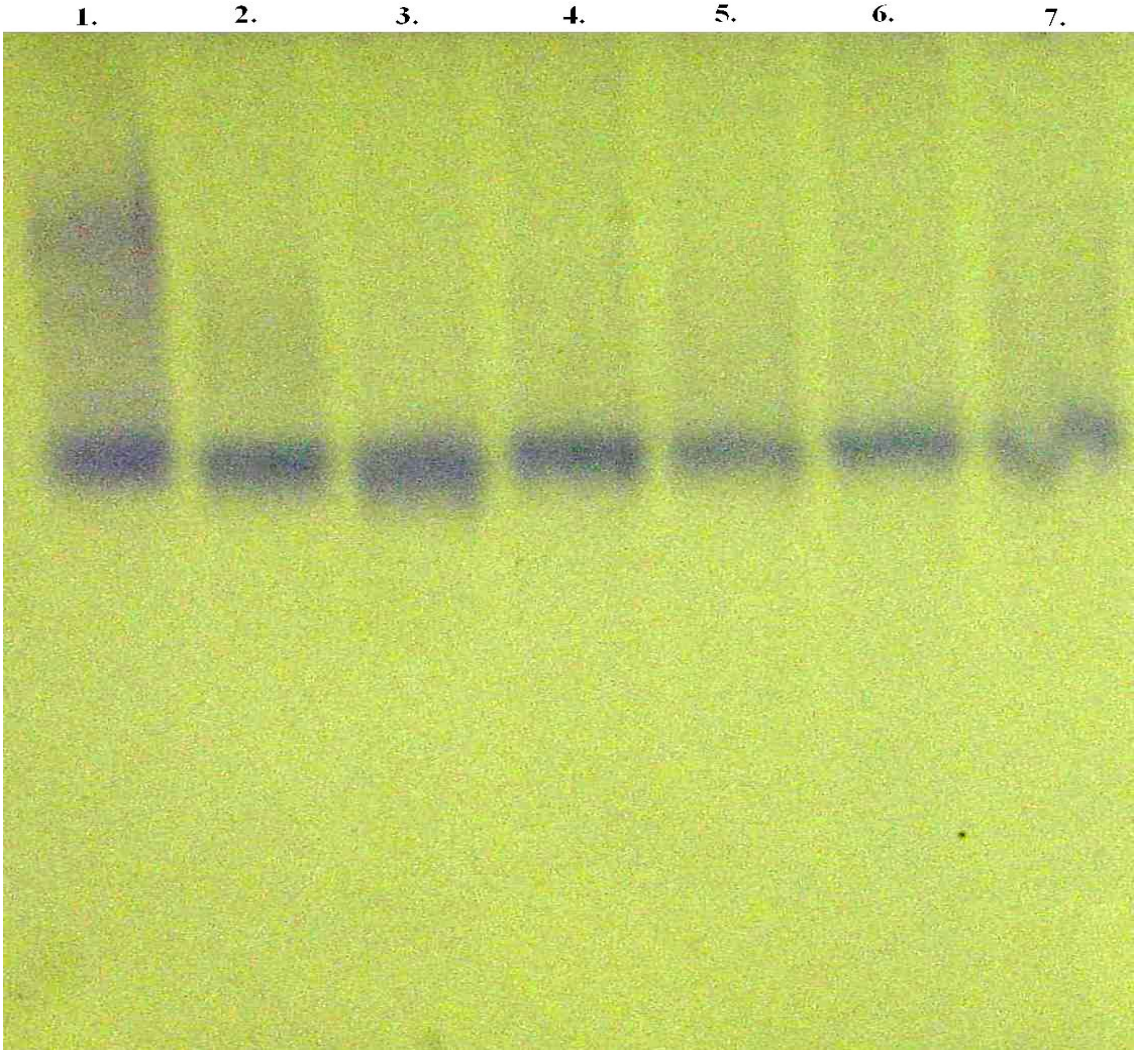
Deveci vd. (2004) ile Ünyayar vd. (2005) tarafından yapılan iki ayrı çalışmada *Funalia trogii* ATCC 200800' den elde edilen lakkaz enziminin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 65 kDa olduğu ifade edilmiştir [183, 184].

Lorenzo vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada ise *Trametes versicolor*' dan elde edilen kültür sıvısında iki lakkaz izoenziminin bulunduğu birinci izoenzimin yaklaşık 65 kDa, diğerinin ise 60 kDa moleküler ağırlığında olduğu saptanmıştır [185].

*Trametes versicolor* kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ise enzimin jel üzerinde tek bant halinde bulunduğu ve moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 67 kDa olduğu ifade edilmiştir [186].

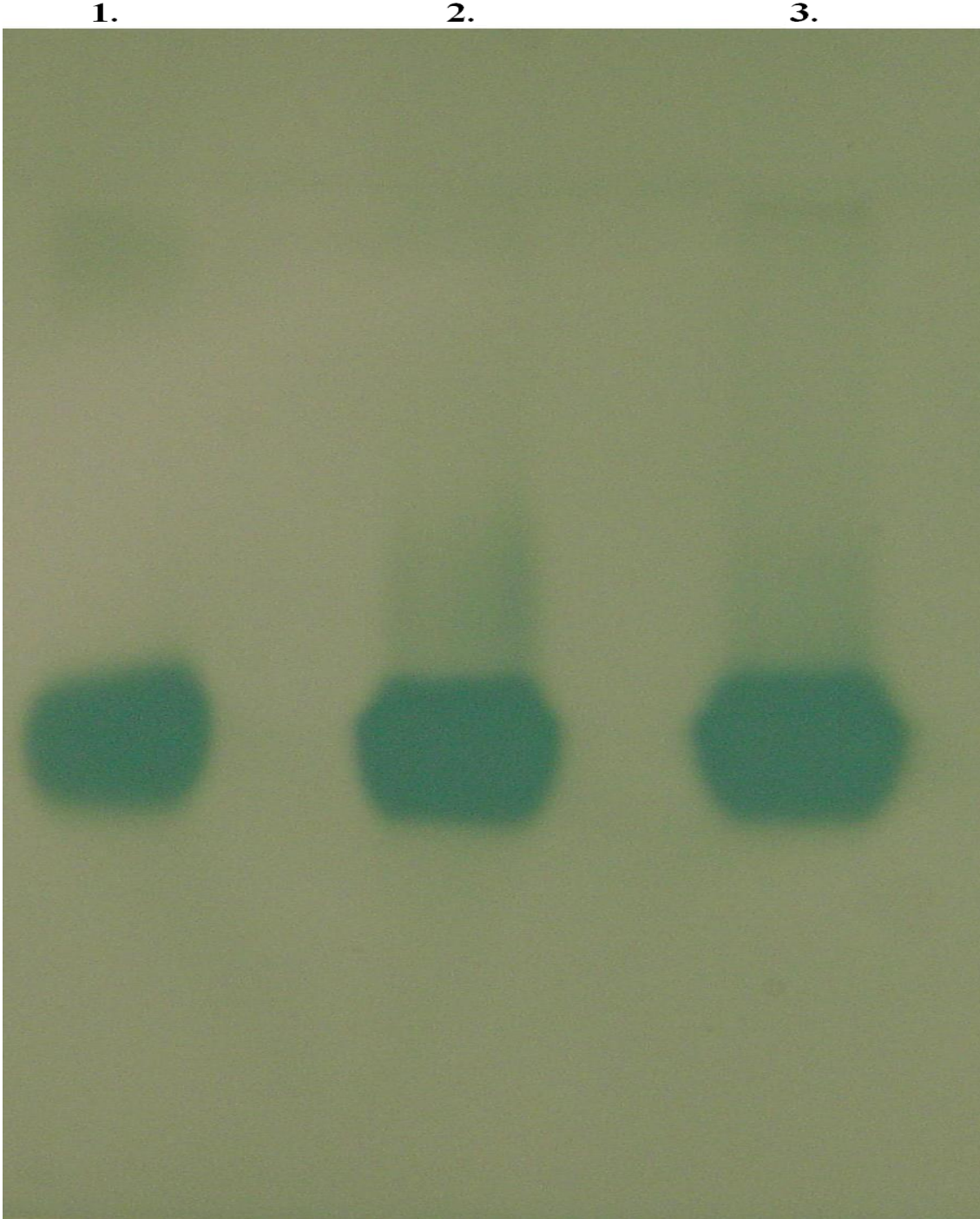
#### **4.9. Çeşitli Ortamlarda Üretilen *F. trogii* ve *T. versicolor* Lakkazlarının Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Gösterilmesi**

Doğal poliakrilamid jel elektrofrez çalışmasının birinci aşamasında STO+Cu ortamı ve aynı ortama çeşitli indükleyici maddeler ilave edilerek bu ortamlarda inkübe edilen fungusların yüksek oranlarda sentezlediği lakkaz enzimleri doğal poliakrilamid jel elektrofrezinde yürütüldü. Daha sonra jeldeki bantların belirlenmesi için Coomassie boyama yapılarak enzimin jel üzerindeki doğal görünümü belirlendi (Şekil 4.49).



**Şekil 4.49.** *F. trogii* ve *T. versicolor* ham kültür filtratlarındaki lakkaz enzimlerinin doğal poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmesi (Coomassie boyama) **1.** Ticari lakkaz, **2.** STO+0.5 mM Cu (*F. trogii*), **3.** STO+Cu+0.05 mM ABTS (*F. trogii*), **4.** STO+Cu+0.1 mM 2,5-ksilidin (*F. trogii*), **5.** STO+0.5 mM Cu (*T. versicolor*), **6.** STO+Cu+0.05 mM ABTS (*T. versicolor*), **7.** STO+Cu+0.5 mM 2,5-ksilidin (*T. versicolor*)

Çalışmanın ikinci aşamasında *F. trogii* ve *T. versicolor*' dan elde edilen lakkaz enzimleri doğal poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldükten sonra lakkaz enziminin substratı olan ABTS' yi içeren bir çözelti kullanılarak aktivite boyama yapıldı ve enzimler yeşil renkte tek bant halinde görüntülendi (Şekil 4.50).



**Şekil 4.50.** *F. trogii* ve *T. versicolor* ham kültür filtratlarındaki lakkaz enzimlerinin doğal poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmesi (Aktivite boyama) **1.** Ticari lakkaz, **2.** STO+0.5 mM Cu (*F. trogii*), **3.** STO+0.5 mM Cu (*T. versicolor*)

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada beyaz çürükçül funguslardan *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi optimize edilmiştir. Öncelikle her iki fungusun lakkaz üretimini artırmak için kültür ortamına ilave edilecek en uygun bakır konsantrasyonu tespit etmek amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda (0.25, 0.5, 1, 2, 5 mM)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  eklenmiş besiyerlerinde çalışmalar yapılmış ve her iki fungus için de en uygun bakır konsantrasyonunun 0.5 mM olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen bakır konsantrasyonu temel besiyeri olarak kullanılan STO ortamına ilave edilerek, çalışmalar kontrol olarak STO ve STO+0.5 mM Cu ortamlarında gerçekleştirilmiştir.

Lakkaz üretim veriminin artırılmasında inkübasyon sıcaklığı önemli bir faktör olduğundan, her iki fungus için de çeşitli inkübasyon sıcaklıkları (10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40 °C) test edilmiş ve en uygun inkübasyon sıcaklığının 30 °C olduğu saptanmıştır. Yapılan pek çok çalışmada organizmanın yüksek oranda enzim üretebilmesi için, organizmaya yeterli oranda oksijen ve besin sağlanması gerektiği ifade edilmektedir. Kültür ortamı içerisindeki çözülmüş oksijen ve besinin organizma ile teması yeterli çalkalama işlemi ile gerçekleşmektedir. Bu nedenle, her iki fungus da statik ve çeşitli çalkalama hızlarında (50, 100, 150, 200, 250 rpm) inkübe edilmiş ve en uygun çalkalama hızı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek lakkaz aktivitesi 150 rpm' de saptanmıştır.

Lakkaz üretiminin artırılması açısından önemli faktörlerden biri de ortam pH' sıdır. Çünkü her fungusun yüksek oranda enzim ürettiği bir ortam pH' sı bulunmaktadır. Bu nedenle, her iki fungus türünün de yüksek oranda enzim üreteceği ortam pH' sının saptanması amacıyla funguslar pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0' a ayarlanmış STO ve STO+Cu ortamlarında inkübe edilmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda *F. trogii* için en uygun ortam pH' sının pH 4.0, *T. versicolor* için ise pH 5.0 olduğu belirlenmiştir.

Kültür ortamında bulunan pelet miktarının lakkaz üretimi üzerine etkisini saptayabilmek amacıyla *F. trogii* için 0.23, 0.48, 0.68 g kuru ağırlık/50 mL STO veya STO+Cu, *T. versicolor* için ise 0.21, 0.44, 0.70 g kuru ağırlık/50 mL STO veya STO+Cu test edilmiş ve en uygun pelet miktarının *F. trogii* için 0.68 g, *T. versicolor* için ise 0.70 g kuru ağırlık/50 mL STO veya STO+Cu olduğu saptanarak çalışmalarda kullanılmıştır.

Her optimizasyon çalışmasından çıkan en uygun sonuç diğer bir optimizasyon çalışmasının temelini oluşturmuş, çalışma koşulları elde edilen veriler doğrultusunda düzenlenerek deneyler defalarca tekrarlanmıştır. Yani optimizasyonu yapılan parametre dışındaki tüm koşullar en uygun olacak şekilde ayarlanmıştır. Buna göre çalışmalarda besiyeri olarak, STO ve yapılan optimizasyon çalışmasında en yüksek lakkaz aktivitesinin tespit edildiği STO+0.5 mM Cu kullanılmıştır. Buna ilaveten *F. troglia* peletlerinin kullanıldığı çalışmalarda çalkalama hızı olarak 150 rpm, besiyeri pH' sı olarak pH 4.0, inkübasyon sıcaklığı olarak 30 °C, besiyerlerine ilave edilen pelet miktarı olarak da 0.68 g kuru ağırlık/50 mL STO veya STO+Cu kullanılmıştır. *T. versicolor* peletlerinin kullanıldığı çalışmalarda ise çalkalama hızı olarak 150 rpm, besiyeri pH' sı olarak pH 5.0, inkübasyon sıcaklığı olarak 30 °C, besiyerlerine ilave edilen pelet miktarı olarak da 0.70 g kuru ağırlık/50 mL STO veya STO+Cu kullanılmıştır.

Bölüm 1.5' de bahsedildiği gibi lakkaz enzimi pek çok biyoteknolojik uygulamada kullanım potansiyeline sahip bir enzim olup, kısa inkübasyon periyotlarında ne kadar enzim üretilebildiğini tespit edebilmek amacıyla funguslar tekrarlı kesikli süreçte 12. saate kadar 2, 24. saate kadar 12, 24. saatten itibaren de 24 saatlik aralıklarla taze besiyerlerinde inkübe edilmiştir. Tekrarlı kesikli sürecin en önemli avantajı aynı peletlerin tekrar tekrar kullanılarak peletlerden uzun süre ve yüksek miktarda enzim elde edilebilmesidir. Yapılan çalışmada her iki fungusun da 2 saatte bir kültür sıvısının uzaklaştırılması fungusların enzim üretme kapasitesini düşürmüştür. Bu çalışmaya göre her iki fungusun da en kısa inkübasyon süresi 12 saat olmalıdır. Aynı çalışmada kesikli süreç de kullanılmıştır. Bu yöntemle inkübe edilen peletlerin kültür sıvısı uzaklaştırılmadığı için ortamda sürekli bir enzim birikimi gerçekleşmiştir. Buna göre 12. saate kadar kesikli yöntem ile inkübe edilen fungusların enzim aktivitesinin tekrarlı kesikli süreçte inkübe edilenlere kıyasla daha yüksek olduğu, daha sonraki periyotlarda tekrarlı kesikli süreçte daha fazla enzim üretildiği belirlenmiştir. En uygun inkübasyon periyodunun belirlenmesine yönelik yapılan diğer bir çalışmada funguslar tekrarlı kesikli süreçte 24 saat aralıklarla 12 gün boyunca inkübe edilmiş ve her iki fungus için de en yüksek lakkaz aktivitesinin STO ortamında inkübasyonun 5. gününde, STO+Cu ortamında ise inkübasyonun 6. gününde gerçekleştiği saptanmıştır.

Serbest fungus peletleri ile tutuklanmış peletler arasındaki lakkaz üretim verimini kıyaslamak amacıyla funguslar aljinat jel içerisine tutuklanmış ve tutuklanmış funguslar 12 gün boyunca inkübe edilerek her 24 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüştür.

Yapılan enzim ölçümleri sonucunda tutuklanmış fungusların belirli periyotlarda serbest funguslardan daha yüksek oranda enzim ürettikleri saptanmıştır. Ancak ilerleyen periyotlarda aljinat boncuklarının küresel formunu yavaş yavaş kaybetmesi aktivite kaybına neden olmakta bu da yöntemin dezavantajını oluşturmaktadır. Bu nedenle lakkaz üretim çalışmalarında serbest fungus peletleri kullanılmıştır. Serbest *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin STO+Cu ortamında 12 günlük inkübasyonu sonucunda toplam olarak sırasıyla 255 ve 69 U/mL oranında lakkaz aktivitesi elde edilmiştir.

Enzim üretim verimini etkileyen önemli faktörlerden biri de kullanılan kültür ortamıdır. Bu nedenle funguslar STO ve STO+Cu dışında 0.5 mM bakır eklenmiş ve eklenmemiş Distile su, SDB ve MEB ortamlarında da inkübe edilerek, bu ortamlarda fungusların lakkaz üretim kapasiteleri tespit edilmiştir. Her iki fungusun Distile su ve Distile su+Cu ortamlarında diğer ortamlara kıyasla düşük oranda lakkaz ürettikleri bunun nedeninin ise bu ortamlarda hiçbir besinsel maddenin bulunmayışdır. MEB ve MEB+Cu ortamında inkübe edilen her iki fungusun da SDB ve SDB+Cu ortamında inkübe edilenlere göre daha yüksek oranda lakkaz ürettiği saptanmıştır.

Çalışmada enzim üretimini artırmak amacıyla STO ve STO+Cu temel ortamlarına çeşitli konsantrasyonlarda ABTS, şiringaldazin, guaiakol ve 2,5-ksilidin (2,5-dimetilanilin) gibi farklı indükleyiciler ilave edilmiş ve bu ortamlardaki lakkaz aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir.

ABTS' nin lakkaz üretimi üzerine etkisinin test edildiği yapılan çalışmalarda *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin inkübe edildiği STO ve STO+Cu ortamlarında en yüksek enzim aktivitesi her iki fungus için de 0.05 mM ABTS ilave edilmiş ortamlarda gerçekleşmiştir. *F. trogii* ve *T. versicolor*' un STO+Cu+0.05 mM ABTS ortamında 5 günlük inkübasyonu sonucunda toplam olarak sırasıyla 141 ve 75 U/mL oranında lakkaz aktivitesi elde edilmiştir.

Şiringaldazinin *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkisini saptayabilmek amacıyla yapılan çalışmada *F. trogii*' nin en yüksek lakkaz aktivitesi 0.05 mM şiringaldazin ilave edilmiş STO ve STO+Cu ortamlarında, *T. versicolor*' un ise 0.1 mM şiringaldazin ilave edilmiş STO ve STO+Cu ortamlarında belirlenmiştir. *F. trogii*' nin STO+Cu+0.05 mM, *T. versicolor*' un ise STO+Cu+0.1 mM şiringaldazin ortamında 5 günlük inkübasyonu sonucunda toplam olarak sırasıyla 105 ve 61 U/mL oranında lakkaz aktivitesi elde edilmiştir.

Diğer bir indükleyici olan guaiakolün fungusların enzim üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada *F. trogii* peletlerinin STO ortamındaki en yüksek lakkaz aktivitesi STO+1 mM guaiakol, STO+Cu ortamındaki en yüksek enzim aktivitesi ise 0.1 mM guaiakol eklenmiş ortamda gerçekleşmiştir. *T. versicolor*' un ise STO ve STO+Cu ortamlarındaki en yüksek enzim aktivitesi 1 mM guaiakol eklenmiş ortamlarda saptanmıştır. *F. trogii*' nin STO+Cu+0.1 mM, *T. versicolor*' un ise 1 mM guaiakol ortamında 10 günlük inkübasyonu sonucunda toplam olarak sırasıyla 200 ve 41 U/mL oranında lakkaz aktivitesi elde edilmiştir.

Test edilen indükleyici maddelerden sonucusu olan 2,5-ksilidinin her iki fungusun da lakkaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışma sonucunda *F. trogii* peletlerinin en yüksek lakkaz aktivitesi 0.1 mM 2,5-ksilidin ilave edilmiş STO ve STO+Cu ortamlarında, *T. versicolor* peletlerinin STO ortamındaki en yüksek lakkaz aktivitesi STO+1 mM 2,5-ksilidin, STO+Cu ortamındaki en yüksek enzim aktivitesi ise 0.5 mM 2,5-ksilidin ilave edilmiş ortamda gerçekleşmiştir. *F. trogii*' nin STO+Cu+0.1 mM, *T. versicolor*' un ise STO+Cu+0.5 mM 2,5-ksilidin ortamında 10 günlük inkübasyonu sonucunda toplam olarak sırasıyla 357 ve 206 U/mL oranında lakkaz aktivitesi elde edilmiştir.

Test edilen indükleyici maddelerden lakkaz üretim verimini artıracak konsantrasyonların belirlenmesinin ardından bu ortamlardan alınan örneklerdeki lakkaz enziminin spesifik aktivitelerinin tespiti amacıyla Bradford yöntemi ile protein miktar tayini yapılmıştır. Çalışmanın son aşamasında aynı örnekler SDS PAGE' de, enzim aktivitesi diğerlerine göre daha yüksek olduğu tespit edilen bazı örnekler ise buna ek olarak doğal poliakrilamid jel elektroforezinde elektrik alanda yürütülmüş ve ortamdaki lakkaz enziminin jel üzerinde oluşturduğu bantlar ve enzimin moleküler ağırlığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; yapılan doktora tez çalışmasında serbest ve tutuklanmış fungusların lakkaz üretim verimleri tespit edilmiş yapılacak çalışmalarda serbest fungus peletlerinin kullanımının daha avantajlı olduğu belirlenmiştir. *Funalia trogii* ATCC 200800 ve *Trametes versicolor* ATCC 200801' in lakkaz üretiminin artırılması için gerekli en uygun inkübasyon koşulları ve optimum koşullarda ortama ilave edilebilecek indükleyici maddelerin en etkili konsantrasyonları saptanarak yüksek oranda ve uzun süre lakkaz üretilebileceği gösterilmiştir. *F. trogii* ve *T. versicolor* tarafından yüksek oranda üretilen enzimlerin Bradford yöntemi kullanılarak spesifik aktiviteleri saptanmış ve daha sonra SDS PAGE yöntemiyle enzimlerin moleküler ağırlıkları tespit edilmiştir.



Buna göre *Funalia trogii* ATCC 200800 tarafından sentezlenen lakkaz enziminin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 63 kDa, *Trametes versicolor* ATCC 200801 tarafından sentezlenen lakkaz enziminin moleküler ağırlığının ise yaklaşık olarak 65 kDa olduğu saptanmıştır. Yapılan doğal poliakrilamid jel elektroforezi çalışması ile de hem Coomassie hem de aktivite boyama işlemi yapılarak enzimin jel üzerindeki doğal görünümü belirlenmiştir. Buna göre yapılan bu çalışmalar ışığında her iki fungusun en yüksek lakkaz üretim ortamları, inkübasyon koşulları, ortama ilave edilebilecek indükleyiciler ve bu indükleyicilerin en uygun konsantrasyonları hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Elde edilen veriler ile her iki fungus için de yapılabilecek enzimatik çalışmalar için önemli bir zemin hazırlanmıştır.

Her geçen gün daha da gelişen pek çok endüstriyel alanda yoğun kullanım potansiyeline sahip lakkaz enziminin üretimi bu alanlarda kullanılabilmesi için yeterli değildir. Bu amaçla üretimin artırılmasına yönelik olarak, yüksek oranda lakkaz üreten yeni mikroorganizmaların araştırılması, lakkaz üreten organizmaların lakkaz üretimini artıracak koşulların tespiti son derece önemlidir. Test edilen organizmanın enzim üretimini artıracak ortamların ve bu ortamlara eklenebilecek indükleyici ve uygun konsantrasyonlarının tespiti de enzim üretiminin artırılması için oldukça önemlidir.

Buna göre; lakkaz üretiminin artırılmasına yönelik çalışmalar sonucunda düşük maliyetle, yüksek miktarda üretilecek enzim her geçen gün artan insan nüfusu ve talep doğrultusunda gelişen ve çeşitlenen birçok endüstriyel alanda kullanılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] E. Birhanlı, *Mikroorganizmaların Lakkaz Üretimine Çeşitli Faktörlerin Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2003.
- [2] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Biyoteknoloji>
- [3] [http://advantageaustria.org/tr/zentral/focus/technology/biotechnologie\\_generell.tr.jsp](http://advantageaustria.org/tr/zentral/focus/technology/biotechnologie_generell.tr.jsp)
- [4] <http://www.123biotech.com/variants-of-biotechnology.shtml>
- [5] [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582004000300001&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582004000300001&script=sci_arttext)
- [6] <http://www10net-kuresel-isinin-hayir-seo.kozlucakoyu.net/Cevre-ve-Cevre-Kirliligi.html>
- [7] Dr. E. Güney, *Çevre ve İnsan-toplum doğa ilişkileri*, Çantay Kitabevi, (2003) 13.
- [8] <http://w3.gazi.edu.tr/web/alperal/cevre1.htm>
- [9] [http://birimweb.icisleri.gov.tr/tid/dergi/444\\_125\\_138.doc](http://birimweb.icisleri.gov.tr/tid/dergi/444_125_138.doc)
- [10] M. Wainwright, *An introduction to fungal biotechnology*, J. Wiley and Sons Ltd., England, (1992) 2, 3, 5.
- [11] D. R. Berry, *Physiology of industrial fungi*, Blackwell Scientific Publications, (1988) 270–271.
- [12] J.W. Bennett, *Mycotechnology: The role of fungi in biotechnology*, **J. Biotech.**, 66 (1998) 101–107.
- [13] M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker, *Brock biology of microorganisms*, Pearson Education International, (2003) 972.
- [14] [www.developingfoods.com](http://www.developingfoods.com)
- [15] M. J. Carlile, S. C. Watkinson, G. W. Gooday, *The fungi*, Academic Press, (1994) 306–309, 315, 319, 497.
- [16] <http://chemistry.umeche.maine.edu/Fort/Wood.jpg>
- [17] W. B. Betts (Ed.), *Biodegradation: Natural and synthetic materials*, Springer Verlag, Germany, (1991) 139–150.
- [18] M. J. Waites, N. L. Morgan, J. S. Rockey, G. Higton, *Industrial microbiology: An Introduction*, Blackwell Science Ltd., (2001) 150.
- [19] El-Mansi, C. F. A. Bryce, A. L. Demain, A. R. Alman, *Fermentation microbiology and biotechnology*, Taylor&Francis Group, (2006) 252.
- [20] T. Anke, Chapman & Hall, Weinheim, *Fungal biotechnology*, (1997) 213, 214, 216–219, 221, 222.
- [21] <http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/FungalBiology/woodrots.htm>
- [22] <http://www.pested.msu.edu/Resources/bulletins/pdf/2047/E2047chap7.pdf>
- [23] <http://www.preschem.com/nDECAY.htm>
- [24] <http://www.forestpathology.org>
- [25] <http://www.msn.com>
- [26] [http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf/v01\\_kap05.pdf](http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf/v01_kap05.pdf)
- [27] <http://archive.amol.org.au/recollections/2/3/13.htm>
- [28] <http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/FungalBiology/brownrot.jpg>
- [29] S. Şık, *Tarımsal Bir Atık Olan Pamuk Sapının Bio-pulp Yönünden Kullanabilirliğinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 1994.

- [30] [http://www.411homerepair.com/ideas/General\\_Household/dry\\_rot.shtml](http://www.411homerepair.com/ideas/General_Household/dry_rot.shtml)
- [31] <http://www.palaeos.com/Fungi/Ascomycota/Ascomycota.html>
- [32] M. S. Revankar, S. S. Lele, *Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1*, **Process. Biochem.**, 41 (2006) 581–588.
- [33] [http://www.germology.com/wood\\_rot.htm](http://www.germology.com/wood_rot.htm)
- [34] R.A. Eaton, M. D. C. Hale, *Wood: Decay, pests and protection*, Chapman and Hall, (1993) 546.
- [35] D. T. D' Souza, R. Tiwari, A. K. Sah, C. Raghukumar, *Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes*, **Enzyme Microbial Technol.**, 38 (2006) 504–511.
- [36] [http://www.world-of-fungi.org/Mostly\\_Mycology/Lucy\\_Goodeve-Docker\\_bioremediation\\_website/whiterotfungi.htm](http://www.world-of-fungi.org/Mostly_Mycology/Lucy_Goodeve-Docker_bioremediation_website/whiterotfungi.htm).
- [37] D. Pant, A. Adholeya, *Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review*, **Bioresour. Technol.**, 98 (2007) 2321–2334.
- [38] M. J. Han, H. T. Choi, H. G. Song, *Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor**, **The Journal of Microbiology**, (2005) 555–560.
- [39] L. Levin, F. Forchiassin, (Short Communication) *Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycete *Trametes trogii**, **Acta Biotechnol.**, 21 (2001) 179–186.
- [40] <http://scielo.isciii.es/img/im/v8n3/07-Martinez-img/07-Martinez-Fig1.jpg>
- [41] [http://www.riken.go.jp/lab-www/library/publication/review/pdf/No\\_42/42\\_039.pdf](http://www.riken.go.jp/lab-www/library/publication/review/pdf/No_42/42_039.pdf)
- [42] D. S. Arora, P. K. Gill, *Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions*, **Bioresour. Technol.**, 73 (2000) 283–285.
- [43] A. Hatakka, *Lignin-modifying enzymes from selected white rot fungi: production and role in lignin degradation*, **FEMS Microbiol. Rev.**, 13 (1994) 125–135.
- [44] R. A. Zabel and J. J. Morrel, *Wood microbiology: Decay and its prevention*, **Academic Press Inc.**, New York, (1992) 476.
- [45] S. R. Couto, M. A. Sanroman, *Coconut flesh: A novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions. Application to Lissamine Green B decolorization*, **J. Food Eng.**, 71 (2005) 208–213.
- [46] <http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1992/kirk92b.pdf>
- [47] <http://www.springerlink.com/content/xt175577532048xg/>
- [48] F. K. Higson, *Degradation of xenobiotics by white rot fungi*, **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, 122 (1991) 111-152.
- [49] [http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers\\_2004/hamman.pdf](http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers_2004/hamman.pdf)
- [50] L. Bezalel, Y. Hadar, C. E. Cerniglia, *Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus**, **Appl. Environ. Microbiol.**, (1996) 292–295.
- [51] W. L. Chao, S. L. Lee, *Decoloration of azo dyes by three white-rot fungi : influence of carbon source*, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 10 (1994) 556–559.
- [52] D. S. L. Balan, R. T. R. Monteiro, *Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi*, **J. Biotech.**, 89 (2001) 141–145.
- [53] S. Kahraman, Ö. Yeşilada, *Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi*, **Folia Microbiol.**, 46:2 ( 2001) 133–136.

- [54] Ö. Yeşilada, K. Fışkın, *Decolorization of alcoholic waste water by white rot fungi Coriolus versicolor, Funalia trogii and Phanerochaete chrysosporium ME446*, **Tr. J. Biology**, 19 (1995) 191–200.
- [55] S. Ş. Kahraman and Ö. Yeşilada, *Effect of spent cotton on color removal and chemical oxygen demand lowering in olive oil mill wastewater by white rot fungi*, **Folia Microbiol.**, 44:6 (1999) 673–676.
- [56] E. Apohan, *Vinas ve Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyunun Değerlendirilmesi ve Biyolojik İyileştirilmesinde Beyaz Çürükçül Fungus Peletlerinin Kullanımı*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2007.
- [57] Ö. Yeşilada, S. Şık, M. Şam, *Treatment of olive oil mill wastewater with fungi*, **Tr. J. Biology**, 23 (1999) 231–240.
- [58] J. K. Glenn, M. H. Gold, *Decolorization of special polymeric dyes by the lignin degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 45 (1983) 1741-1747.
- [59] M. Freitag, J. J. Morrell, *Decolourization of the polymeric dye Poly R-478 by wood inhabiting fungi*, **Can. J. Microbiol.**, 38 (1992) 811–822.
- [60] S. Cing, D. Asma, E. Apohan, O. Yesilada, *Decolorization of textile dyeing wastewater by Phanerochaete chrysosporium*, **Folia Microbiol.** 48:5 (2003) 639–642.
- [61] Ö. Yeşilada, *Decolorization of crystal violet by fungi and commercial horseradish peroxidase*, **Tr. J. Biology**, 20 (1996) 129–138.
- [62] Ö. Yeşilada, *Decolorization of crystal violet by fungi*, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 11 (1995) 601-602.
- [63] R. Say, A. Denizli, M. Y. Arica, *Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus Phanerochaete chrysosporium*, **Bioresour. Technology**, 76 (2001) 67–70.
- [64] P. Baldrian, *Interactions of heavy metals with white-rot fungi*, **Enzyme Microbial Technol.**, 32 (2003) 78–91.
- [65] E. Apohan, *Biyoteknolojik İşlemden Geçmiş ve Geçmemiş Tekstil Fabrikası Boyalarının Çeşitli Organizmalar Üzerine Toksik Etkisinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2001.
- [66] M. S. Cohen, P. D. Gabriele, *Degradation of coal by the fungi Polyporus versicolor and Poria monticola*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 44 (1982) 23-27.
- [67] M. S. Cohen, P. D. Gabrielle, *Degradation of coal by fungi Polyporus versicolor and Poria monticolor*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 44 (1987) 212–219.
- [68] R. A. Blanchette, J. R. Obst, J. I. Hedges, K. Weliky, *Resistance of hardwood vessels to degradation by white rot basidiomycetes*, **Can. J. Bot.**, 66 (1988) 1841–1847.
- [69] D. S. Arora, P. K. Gill, *Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions*, **Bioresour. Technol.**, 73 (2000) 283–285.
- [70] S. Kahraman, Ö. Yeşilada, *Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi*, **Folia Microbiol.**, 46:2 (2001) 133–136.
- [71] J. Rogalski, T. Lundell, A. Leonowicz, A. Hatakka, *Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of Trametes versicolor depending on culture conditions*, **Acta Microbiol. Pol.**, 40 (1991) 221–234.

- [72] E. Birhanli, O. Yesilada, *Increased production of laccase by pellets of Funalia trogii ATCC 200800 and Trametes versicolor 200801 in repeated-batch mode*, **Enzyme Microbial Technol.**, 39 (2006) 1286–1293.
- [73] B. Otlu, *Peyniraltı Suyu ve Alkol Fabrikası Atıksularının Arıtımı ve Değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2002.
- [74] Ö. Yeşilada, Ş. F. Topçuoğlu, A. Ünyayar, S. Ünyayar, K. Fışkın, S. Bozcuk, *Şlempe (vinnase) içeren inkübasyon ortamında bazı beyaz çürükçül funguslarda absisik asid (ABA) üretimi*, X. Ulusal Biyoloji Kongresi 18–20 Temmuz, Erzurum (1990).
- [75] S. Kahraman, *Endüstriyel ve Tarımsal Atıkların Biyoteknolojik Olarak Değerlendirilmesinde Yeni Bir Yaklaşım*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 1998.
- [76] M. Tien, T. K. Kirk, *Lignin degrading enzyme from the hymenomycete Phanerochaete chrysosporium Burds*, **Science**, 221 (1983) 661–663.
- [77] M. Leisola, R. Waldner, F. Zadrazil, P. Reinigier, *Production, characterisation and mechanism of lignin peroxidases. In treatment of lignocellulosics with white-rot fungi*, **Elsevier**, (1988) 37–42.
- [78] <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=2763517>
- [79] A. Paszczynski, V. B. Huynh, R. L. Crawford, *Enzymatic activities of an extracellular manganese dependent peroxidase from Phanerochaete chrysosporium*, **Arch. Biochem. Biophys.**, 29 (1985) 37–41.
- [80] V. Renganatham, K. Miki, M. H. Gold, *Multiple molecular forms of diarylpropane oxygenase, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring, lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium*, **Arch. Biochem. Biophys.**, 241 (1985) 304–314.
- [81] A. I. Yaropolov, O. V. Skorobogatko, S. S. Vartanov and S. D. Varfolomeyev, *Laccase properties, catalytic mechanism and applicability*, **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 49 (1994) 257–280.
- [82] A. M. Mayer, R. C. Staples, *Laccase: New functions for an old enzyme*, **Phytochemistry**, 60 (2002) 551–565.
- [83] T. Mechichi, N. Mhiri, S. Sayadi, *Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from Trametes trogii*, **Chemosphere**, 64 (2006) 998–1005
- [84] S. Riva, *Laccases: blue enzymes for green chemistry*, **Trends Biotechnol.**, 24:5 (2006) 219–226.
- [85] <http://www.nature.com/nsmb/journal/v9/n8/full/nsb823.html>
- [86] H. Claus, *Laccases: structure, reactions, distribution*, **Micron**, 35 (2004) 93–96.
- [87] T. Mechichi, N. Mhiri, S. Sayadi, *Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from Trametes trogii*, **Chemosphere**, 64 (2006) 998–1005.
- [88] M. Zhang, F. Wu, Z. Wei, Y. Xiao, W. Gong, *Characterization and decolorization ability of a laccase from Panus rudis*, **Enzyme Microbial Technol.**, 39 (2006) 92–97.
- [89] R. C. Minussi, M. A. Miranda, J. A. Silva, C. V. Ferreira, Hiroshi, Aoyama, S. Marangoni, D. Rotilio, G. M. Pastore, N. Durán, *Purification, characterization and application of laccase from Trametes versicolor for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole*, **Afr. J. Biotechnol.**, 6:10 (2007) 1248–1254.

- [90] R. C. Minussi, G. M. Pastore, N. Duran, *Potential applications of laccase in the food industry*, **Trends Food Sci. Technol.**, 13 (2002) 205–216.
- [91] R. Bourbonnais, M. Paice, *Oxidation of non-phenolic substrates, an expanded role for laccase in lignin biodegradation*, **FEBS Lett.**, 267 (1990) 99–102.
- [92] A. Gnanamani, M. Jayaprakashvel, M. Arulmani, S. Sadulla, *Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in Phanerochaete chrysosporium NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes*, **Enzyme Microbial Technol.**, 38 (2006) 1017–1021.
- [93] C. G. Whiteley, D.-J. Lee *Enzyme technology and biological remediation (Review)*, **Enzyme Microbial Technol.**, 38 (2006) 291–316.
- [94] S. Camarero, D. Ibarra, A. T. Mart'inez, J. Romero, A. Guti'erez, J. C. del R'io, *Paper pulp delignification using laccase and natural mediators*, **Enzyme Microbial Technol.**, 40 (2007) 1264–1271.
- [95] S. R. Couto, J. L. T. Herrera, *Laccase production at reactor scale by filamentous fungi*, **Biotech. Adv.**, 25 (2007) 558–569.
- [96] C. Eggert, U. Temp, J. F. D. Dean, K.E. L. Eriksson, *A fungal metabolite mediates degradation of non phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase*, **FEBS Lett.**, 391 (1996b) 144–148.
- [97] <http://www.biochemsoctrans.org/bst/034/0304/bst0340304f01.gif>
- [98] <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood2.html>
- [99] S. R. Couto, J. L. T. Herrera, *Industrial and biotechnological applications of laccases: A review*, **Biotech. Adv.**, 24 (2006) 500–513.
- [100] C. G. Whiteley, D.-J. Lee, *Enzyme technology and biological remediation (Review)*, **Enzyme Microbial Technol.**, 38 (2006) 291–316.
- [101] M. Gavrilescu, Y. Chisti, *Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry*, **Biotech. Adv.**, 23 (2005) 471–499.
- [102] E. Forgacs, T. Cserha'tia, G. Oros, *Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review*, **Environ. Int.** 30 (2004) 953–971.
- [103] S. Dhawan, R. Lal, M. Hanspal, R. C. Kuhad, *Effect of antibiotics on growth and laccase production from Cyathus bulleri and Pycnoporus cinnabarinus*, **Bioresour. Technol.**, 96 (2005) 1415–1418.
- [104] S. R. Couto, J. L. T. Herrera, *Laccases in the textile industry*, **Biotech. Mol. Biol. Rev.**, 1:4 (2006) 117–122.
- [105] M. Zhang, F. Wu, Z. Wei, Y. Xiao, W. Gong, *Characterization and decolorization ability of a laccase from Panus rudis*, **Enzyme Microbial Technol.**, 39 (2006) 92–97.
- [106] D. Annibale, A. Stazi, S. R. Vinciguerra, V. D. Mattia, E.&G. Sermanni, *Characterization of immobilized laccase from Lentinus edodes and its use in olive-mill wastewater treatment*. **Process Biochem.**, (1999) 34, 697–706.
- [107] M. Alcalde, M. Ferrer, F. J. Plou, A. Ballesteros, *Environmental biocatalysis: From remediation with enzymes to novel green processes*, **Trends Biotechnol.**, 24:6 (2006) 281–287.
- [108] I. Y. Lee, K. H. Jung, C. H. Lee, Y. H. Park, *Enhanced production of laccase in Trametes versicolor by the addition of ethanol*, **Biotech. Lett.**, 21 (1999) 965–968.
- [109] <http://www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2004/P556.pdf>
- [110] S. Cheong, S. Yeo, H. G. Song, H. T. Choi, *Determination of laccase gene expression during degradation of 2,4,6-trinitrotoluene and its catabolic intermediates in Trametes versicolor*, **Microbiol. Res.**, 161 (2006) 316–320.

- [111] <http://www.freshpatents.com/Novel-laccase-enzyme-and-use-thereofdt20060323ptan20060063246.php>
- [112] S. Larsson, P. Cassland, L. J. Jonsson, *Development of a Saccharomyces cerevisiae strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 67 (2001) 1163–1170.
- [113] D. Odaci, S. Timur, N. Pazarlioglu, M. R. Montereali, W. Vastarella, R. Pilloton, A. Telefoncu, *Determination of phenolic acids using Trametes versicolor laccase*, **Talanta**, 71 (2007) 312–317.
- [114] J. J. Roy, T. E. Abraham, *Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase*, **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, 38 (2006) 31–36.
- [115] R. A. Simkus, V. Laurinavicius, *Laccase containing sol-gel as a signal enhancer in optical bioassay of aromatic amines*, **Biologica**, 1:2 (1995) 44–46.
- [116] R. A. Simkus, V. Laurinavicius, L. Boguslavsky, T. Skotheim, S. Tanenbaum, S. Nakas, D. J. Slomczynski, *Laccase containing sol-gel based optical biosensors*, **Anal. Lett.**, 29 (1996) 1907–1919.
- [117] D. B. Papkovsky, A. L. Ghindilis, I. N. Kurochkin, *Flow-cell fiberoptic enzyme sensor for phenols*, **Anal. Lett.**, 26 (1993) 1505–1518.
- [118] <http://www.freshpatents.com/Novel-laccase-enzyme-and-use-thereofdt20060323ptan20060063246.php>
- [119] <http://www.enzymeindia.com/enzymes/laccase.asp>
- [120] <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v52je06.htm>
- [121] O. Brenna, E. Bianchi, *Immobilised laccase for phenolic removal in must and wine*, **Biotech. Lett.**, 16:1 (1994) 35–40.
- [122] A. Zamorani, I. C. Cantarelli, G. Lanzarini (Eds.), *Enzymatic processing of musts and wines. In Biotechnology applications in beverage production*, **Elsevier Applied Science: New York**, (1989) 223–246.
- [123] R. C. Minussi, M. Rossi, L. Bologna, D. Rotilio, G. M. Pastore, N. Durán, *Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase*, **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, 45 (2007) 102–107.
- [124] <http://www.freshpatents.com/Novel-laccase-enzyme-and-use-thereofdt20060323ptan20060063246.php>
- [125] S. R. Couto, J. L. T. Herrera, *Laccases in the textile industry*, **Biotech. Mol. Biol. Review**, 1:4 (2006) 117–122.
- [126] D. S. L. Balan, R. T. R. Monteiro, *Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi*, **J. Biotech.**, 89 (2001) 141–145.
- [127] G. S. Nyanhongo, J. Gomes, G. M. Gübitz, R. Zvauya, J. Read, W. Steiner, *Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of Trametes modesta*, **Water Res.**, 36 (2002) 1449–1456.
- [128] R. Campos, A. Kandelbauer, K. H. Robra, A. Cavaco-Paulo, G. M. Gübitz, *Indigo degradation with purified laccases from Trametes hirsuta and Sclerotium rolfssii*, **J. Biotech.**, 89 (2001) 131–139.
- [129] [http://www.genencor.com/cms/connect/genencor/products\\_and\\_services/newsgen\\_businessupdate\\_391\\_en.htm](http://www.genencor.com/cms/connect/genencor/products_and_services/newsgen_businessupdate_391_en.htm)
- [130] O. Kirk, T. V. Borchert, C. C. Fuglsang, *Industrial enzyme applications*, **Curr. Opin. Biotechnol.**, 13 (2002) 345–351.
- [131] A. Kunamneni, I. Ghazi, S. Camarero, A. Ballesteros, F. J. Plou, M. Alcalde, *Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers*, **Process Biochem.**, 43 (2008) 169–178.

- [132] A. Michniewicz, S. Ledakowicz, R. Ullrich, M. Hofrichter, *Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor**, **Dyes Pigm.**, 77 (2008) 295–302.
- [133] M. Zhang, F. Wu, Z. Wei, Y. Xiao, W. Gong, *Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis**, **Enzyme Microbial Technol.**, 39 (2006) 92–97.
- [134] S. R. Couto, *Short communication Decolouration of industrial azo dyes by crude laccase from *Trametes hirsuta**, **J. Hazard. Mater.**, 148 (2007) 768–770
- [135] C. B. S. Pickard, M. V. Duhalt R, Heler, *Electroreduction of O<sub>2</sub> to water at 0.6 V (NHE) at pH 7 on the 'wired' *Pleurotus ostreatus* Laccase Cathode*. **Biosens. Bioelectron.**, 17 (2002) 1071–1074.
- [136] [http://www.csir.co.za/enews/2007\\_dec/bio\\_02.html](http://www.csir.co.za/enews/2007_dec/bio_02.html)
- [137] <http://www.freepatentsonline.com/EP0958806.html>
- [138] Baldrian P., Gabriel J., *Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus**, **FEMS Microbiol. Lett.**, 206 (2002) 69–74.
- [139] G. Palmieri, C. Bianco, G. Cennamo, P. Giardina, G. Marino, M. Monti, G. Sannia, *Purification, characterization and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus**. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67 (2001) 2754–2759.
- [140] K. K. Prasad, S. V. Mohan, Y. V. Bhaskar, S. V. Ramanaiyah, V. L. Babu, B. R. Pati, P. N. Sarma, *Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: Influence of culture conditions*, **The Journal of Microbiology**, (2005) 301–307.
- [141] G. Janusz, J. Rogalski, M. Barwińska, J. Szczodrak, *Effects of culture conditions on production of extracellular laccase by *Rhizoctania praticola**, **Polish Journal of Microbiology**, 55:4 (2006) 309–319.
- [142] L. Cordi, C. R. Minussi, S. R. Freire, N. Durán, *Fungal Laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement*, **Afr. J. Biotechnol.** 6:10 (2007) 1255–1259.
- [143] J. R. P. Cavallazzi, C. M. Kasuya, M. A. Soares, *Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium*, **Brazilian Journal of Microbiology** 36 (2005) 383–387.
- [144] G. K. Tychanowicz, D. F. de Souza, C. G. M. Souza, M. K. Kadowaki, R. M. Peralta, *Copper improves the production of laccase by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation*, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49:5 (2006) 699–704.
- [145] M. Lorenzo, D. Moldes, M. Á. Sanromán, *Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes*, **Chemosphere**, 63 (2006) 912–917.
- [146] E. Rosales, S. R. Couto, M. A. Sanroman, *Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings*, **Enzyme Microbial Technol.**, 40 (2007) 1286–1290.
- [147] R. C. Minussi, G. M. Pastore, N. Duran, *Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent*, **Bioresour. Technol.**, 98 (2007) 158–164.
- [148] H. Z. Mechichi, T. Mechichi, A. Dhouib, S. Sayadi, A. T. Martínez, M. J. Martínez, *Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme*, **Enzyme Microbial Technol.**, 39 (2006) 141–148.



- [149] S. R. Couto, E. Rosales, M. Gundín, M. Á. Sanromán, *Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two Trametes species*, **J. Food Eng.**, 64 (2004) 423–428.
- [150] S. R. Couto, M. A. Sanromán, *Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by Trametes hirsuta under solid-state conditions: Application to Lissamine Green B decolorization*, **J. Food Eng.**, 71 (2005) 208–213.
- [151] H. Hou, J. Zhou, J. Wang, C. Du, B. Yan, *Enhancement of laccase production by Pleurotus ostreatus and its use for the decolorization of anthraquinone dye*, **Process Biochem.**, 39 (2004) 1415–1419.
- [152] C. Galhaup, D. Haltrich, *Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus Trametes pubescens in the presence of copper*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 56 (2001) 225–232.
- [153] C. Galhaup, H. Wagner, B. Hinterstoisser, D. Haltrich, *Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete Trametes pubescens*, **Enzyme Microbial Technol.** 30 (2002) 529–536.
- [154] G. Palmieri, P. Giardina, C. Bianco, B. Fontanella and G. Sannia, *Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus Pleurotus ostreatus*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 66 (2000) 920–924.
- [155] P. Baldrian, J. Gabriel, F. Freud, *Effect of cadmium on the ligninolytic activity of Stereum hirsutum and Phanerochaete chrysosporium*, **Folia Microbiol.**, 41: 4 (1996) 363–367.
- [156] N. Hatvani, I. Mécs, *Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of Lentinula edodes*, **Ecotoxicol. Environ. Safety**, 55 (2003) 199–203.
- [157] J. Swamy, J. A. Ramsay, *Effects of  $Mn^{2+}$  and  $NH_4^+$  concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by Trametes versicolor*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 51 (1999) 391–396.
- [158] P. Baldrian, J. Gabriel, *Lignocellulose degradation by Pleurotus ostreatus in the presence of cadmium*, **FEMS Microbiol. Lett.**, 220 (2003) 235–240.
- [159] M. Lorenzo, D. Moldes, S. R. Couto, A. Sanromán, *Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of Trametes versicolor*, **Bioresour. Technol.**, 82 (2002) 109–113.
- [160] D. S. Arora, P. K. Gill, *Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi*, **Bioresour. Technol.**, 77 (2001) 89–91.
- [161] S. Dhawan, R. C. Kuhad, *Effect of amino acids and vitamins on laccase production by the bird's nest fungus Cyathus bulleri*, **Bioresour. Technol.**, 84 (2002) 35–38.
- [162] M. Y. Jang, W. R. Ryu, M. H. Cho, *Laccase production from repeated batch cultures using free mycelia of Trametes sp.*, **Enzyme Microbial Technol.**, 30 (2002) 741–746.
- [163] G. Rancaño, M. Lorenzo, N. Molares, S. Rodríguez Couto, M. Á. Sanromán, *Production of laccase by Trametes versicolor in an airlift fermentor*, **Process Biochem.**, 39 (2003) 467–473.
- [164] S. R. Couto, M. Gundín, M. Lorenzo, M. Á. Sanromán, *Screening of supports and inducers for laccase production by Trametes versicolor in semi-solid-state conditions*, **Process Biochem.**, 38 (2002) 249–255.
- [165] G. S. Nyanhongo, J. Gomes, G. Gübitz, R. Zvauya, J. S. Read, W. Steiner, *Production of laccase by a newly isolated strain of Trametes modesta*, **Bioresour. Technol.**, 84 (2002) 259–263.

- [166] N. K. Pazarlıoğlu, M. Sarişik, A. Telefoncu, *Laccase: production by Trametes versicolor and application to denim washing*, **Process Biochem.**, 40 (2005) 1673–1678.
- [167] M. Jaszek, K. Grzywnowicz, E. Malarczyk, A. Leonowicz, *Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: Trametes versicolor and Abortiporus biennis to paraquat-caused oxidative stress conditions*, **Pest. Biochem. Physiol.**, 85 (2006) 147–154.
- [168] V. Shah, P. Baldrian, I. Eichlerova, R. Dave, D. Madamwar, F. Nerud, R. Gross, *Influence of dimethyl sulfoxide on extracellular enzyme production by Pleurotus ostreatus*, **Biotech. Lett.**, 28 (2006) 651–655.
- [169] M. Stajić, L. Persky, D. Friesem, Y. Hadar, S. P. Wasser, E. Nevo, J. Vukojević, *Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected Pleurotus species*, **Enzyme Microbial Technol.**, 38 (2006) 65–73.
- [170] C. Park, B. Lee, E. J. Han, J. Lee, S. Kim, *Decolorization of acid black 52 by fungal immobilization*, **Enzyme Microbial Technol.**, 39 (2006) 371–374
- [171] <http://web.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter6/F06-19.jpg>
- [172] A. F. D. Vasconcelos, A. M. Barbosa, R. F. H. Dekker, I. S. Scarminio, M. I. Rezende, *Optimization of laccase production by Botryosphaeria sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method*, **Process Biochem.**, 35 (2000) 1131–1138.
- [173] J. C. Meza, R. Auria, A. Lomascolo, J. C. Sigoillot, L. Casalot, *Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in Pycnoporus cinnabarinus ss3*, **Enzyme Microbial Technol.**, 41 (2007) 162–168.
- [174] J. W. Wang, J. H. Wu, W. Y. Huang, R. X. Tan, *Laccase production by Monotospora sp., an endophytic fungus in Cynodon dactylon*, **Bioresour. Technol.**, 97 (2006) 786–789.
- [175] M. T. Moreira, C. Palma, G. Feijoo, J. M. Lema, *Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors*, **J. Biotech.**, 66 (1998) 27–39.
- [176] O. V. Koroleva, E. V. Stepanova, V. P. Gavrilova, N. S. Yakovleva, E. O. Landesman, I. S. Yavmetdinov, A. I. Yaropolov, *Laccase and Mn-Peroxidase production by Coriolus hirsutus strain 075 in a jar fermentor*, **J. Biosci. Bioeng.**, 93:5 (2002) 449–455.
- [177] S. Vikineswary, N. Abdullah, M. Renuvathani, M. Sekaran, A. Pandey, E.B.G. Jones, *Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by Pycnoporus sanguineus*, **Bioresour. Technol.**, 97 (2006) 171–177.
- [178] J. F. Osmá, V. Saravia, J. L. T. Herrera, S. R. Couto, *Mandarin peelings: The best carbon source to produce laccase by static cultures of Trametes pubescens*, **Chemosphere**, 67 (2007) 1677–1680.
- [179] O. V. K. Skorobogat'ko, E. V. Stepanova, V. P. Gavrilova, O. V. Morozova, N. V. Lubimova, A. N. Dzchafarova, A. I. Yaropolov, A. Makower, *Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete Coriolus hirsutus and effect of inducers on laccase synthesis*, **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 28 (1998) 47–54.
- [180] I. Y. Lee, K. H. Jung, C. H. Lee, Y. H. Park, *Enhanced production of laccase in Trametes versicolor by the addition of ethanol*, **Biotech. Lett.**, 21 (1999) 965–968.

- [181] H. Jung, F. Xu, K. Li, *Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus Trichophyton rubrum LKY-7*, **Enzyme Microbial Technol.**, 30 (2002) 161–168.
- [182] T. Saito, P. Hong, K. Kato, M. Okazaki, H. Inagaki, S. Maeda, Y. Yokogawa, *Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil*, **Enzyme Microbial Technol.**, 33 (2003) 520–526.
- [183] T. Deveci, A. Unyayar, M. A. Mazmanci, *Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of Funalia trogii ATCC 200800*, **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, 30 (2004) 25–32.
- [184] A. Ünyayar, M. A. Mazmanci, H. Ataçağ, E. A. Erkurt, G. Coral, *A Drimaren Blue X3LR dye decolorizing enzyme from Funalia trogii: One step isolation and identification*, **Enzyme Microbial Technol.**, 36 (2005) 10–16.
- [185] M. Lorenzo, D. Moldes, M<sup>a</sup>. Á. Sanromán, *Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by Trametes versicolor and on their ability to decolourise dyes*, **Chemosphere**, 63 (2006) 912–917.
- [186] I. Matijošytė, I. W.C.E. Arends, R. A. Sheldon, S. D. Vries, *Pre-steady state kinetic studies on the microsecond time scale of the laccase from Trametes versicolor*, **Inorg. Chim. Acta**, 361 (2008) 1202–1206.

## ÖZGEÇMİŞ

17.07.1978 tarihinde Malatya’ da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Malatya’ da tamamladı. 1997 Yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nde lisans eğitime başladı ve 2001 yılında mezun oldu. 2001 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitime başladı. 2003 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak, aynı yıl İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitime başladı. 2002 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne Genel Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak atanan Emre BİRHANLI halen görevini devam ettirmektedir.